N° C.N.R.S.
A.O. 8652

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Pierre RIPOCHE

REAJUSTEMENTS OSMOTIQUES ET REGULATION CELLULAIRE DE LA PERMEABILITE A L'EAU DE LA VESSIE DE GRENOUILLE

Soutenue le 23 juin 1973, devant la Commission d'Examen

MM. A. JOST — Président

F. MOREL
S. JARD
J. MAETZ — Examinateurs

N° C.N.R.S.
A.O. 8652

THESE

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE PARIS VI

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES NATURELLES

par

Pierre RIPOCHE

REAJUSTEMENTS OSMOTIQUES ET REGULATION CELLULAIRE DE LA PERMEABILITE A L'EAU DE LA VESSIE DE GRENOUILLE

Soutenue le 23 juin 1973, devant la Commission d'Examen

MM.	A. JOST	Président
	F. MOREL	Examinateurs
	S. JARD	
	J. MAETZ	

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TABLE DES MATIERES

- INTRODUCTION

- CHAPITRE I - PERMEABILITE A L'EAU DE LA VESSIE GRENOUILLE

I.1 - Rappels morphologiques

I.2 - Les mouvements d'eau à travers la vessie

I.2.1 - Perméabilité de diffusion

I.2.2 - Perméabilité osmotique

I.3 - Transport de sodium

I.4 - Mécanisme cellulaire de l'action de l'A.D.H.

I.5 - Action des milieux hypertoniques

- CHAPITRE II - MATERIEL ET METHODES

II.1 - Le matériel biologique

II.2 - Le prélèvement de la vessie

II.3 - La mesure volumétrique du flux net d'eau

II.4 - Autres mesures

II.5 - Milieux de survie et produits utilisés

II.6 - Protocoles expérimentaux

II.7 - Expression des résultats

II.8 - Conditionnement des animaux

II.9 - Influence de la pression hydrostatique

II.10 - Etude morphologique

- CHAPITRE III - ULTRASTRUCTURE DE L'EPITHELIUM DE LA VESSIE DE GRENOUILLE EN PRESENCE DES MILIEUX HYPERTONIQUES

III.1 - Introduction

III.2 - Fixation avant le développement de la réponse au mannitol

III.3 - Fixation au maximum de la réponse

III.4 - Fixation lorsque le compartiment muqueux est hypertonique

III.5 - Perméabilité aux grosses molécules

III.6 - Conclusion

- CHAPITRE IV - ACTION DES MILIEUX HYPERTONIQUES SUR LA PERMEABILITE A L'EAU

IV.1 - Introduction

IV.2 - Description de la cinétique de réponse aux milieux hypertoniques

IV.3 - Etude des paramètres de la réponse au mannitol

IV.4 - Nature du solute

IV.5 - L'hypertonicité du milieu muqueux

IV.6 - Influence de la température d'adaptation des animaux

IV.7 - Influence de la température d'incubation de la préparation

IV.8 - Conclusion

- CHAPITRE V - INTERACTIONS AVEC LE SYSTEME CYCLASIQUE

V.1 - Introduction : le schéma classique

V.2 - Action des catécholamines

V.2.1 - La noradrénaline

V.2.2 - Autres catécholamines

V.2.3 - Récepteurs adrénergiques impliqués

V.2.4 - Influence de la concentration d'AMPc

V.2.5 - Importance du gradient de pression osmotique

V.3 - Action des prostaglandines

V.4 - Autres types d'inhibiteurs

V.5 - Interaction avec les agents activateurs du système cyclasique

V.6 - Influence des milieux hypertoniques sur la réversibilité de l'effet hydrosmotique

V.6.1 - Introduction

V.6.2 - Les résultats

V.7 - Conclusion

- CHAPITRE VI - EFFET DE L'HYPOTONICITE

VI.1 - Introduction

VI.2 - Description d'une expérience type

VI.3 - Critique du protocole expérimental

VI.3.1 - Rôle de la pression hydrostatique

VI.3.2 - L'influence des couches non agitées

VI.3.3 - L'influence du gonflement cellulaire

VI.4 - Influence de la température

VI.5 - Influence de pressions osmotiques variables

VI.6 - Point d'insertion de la boucle

VI.7 - Conclusion

- CHAPITRE VII - PRESENCE D'OSCILLATIONS AU COURS DE LA REPONSE HYDROSMOTIQUE

VII.1 - Introduction

VII.2 - Description des oscillations

VII.3 - Dépendance de la température

VII.4 - Effet de la musculature

VII.5 - Réajustements à une nouvelle valeur d'équilibre

VII.6 - Conclusion

- CHAPITRE VIII - DISCUSSION GENERALE

- CONCLUSION GENERALE

- RESUME

- BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

L'étude des mécanismes cellulaires de contrôle de la perméabilité membranaire à l'eau a connu ces dernières années un regain d'intérêt dû à plusieurs facteurs.

D'une part, l'introduction dans ces recherches d'un matériel biologique particulièrement bien adapté, la vessie des amphibiens (4) et de techniques de mesure des flux, simples, automatiques et précises (13) a permis d'obtenir un grand nombre de données expérimentales relatives tant aux cinétiques de variation de perméabilité qu'aux valeurs caractéristiques de différents états stationnaires. La vessie d'amphibien présente, en effet, une structure très simple. Elle est aisément maintenue en survie et présente, comme le tubule distal du néphron de mammifère, une capacité de réabsorber de l'eau et du sodium. Cette fonction de réabsorption tant in vivo qu'in vitro est sous contrôle hormonal et plus particulièrement sous celui des hormones neurohypophysaires (75).

D'autre part, des progrès importants ont été réalisés dans la compréhension du mécanisme de transmission de l'information par certaines hormones. Il est maintenant acquis que l'adénosine 3', 5'-monophosphate cyclique (AMP_c) joue, pour un grand nombre d'hormones, le rôle de messager intracellulaire (21 , 117 , 118). Les modalités de cette médiation ont été, dans de nombreux cas, élucidées et on a montré

qu'elles s'appliquaient à l'hormone antidiurétique, principe majeur du contrôle endocrinien de la balance hydrique (56 , 92). Un nouveau fil conducteur et un arsenal d'agents pharmacologiques devenaient ainsi disponibles pour l'étude des mécanismes cellulaires du contrôle de la perméabilité membranaire à l'eau par l'hormone antidiurétique. En effet, un certain nombre d'agents chimiques et d'hormones exercent des actions spécifiques en différents points de la chaîne de réactions qui conduit des premières étapes de la stimulation hormonale à l'accroissement du flux net d'eau. Elles permettent donc d'agir à différents niveaux du processus de perméabilisation de la vessie.

Une augmentation de la perméabilité à l'eau a été observée, en l'absence de tout stimulus hormonal, en créant uniquement une hyperosmolarité cellulaire. Cette action a été initialement décrite par BENTLEY sur la vessie de crapaud en 1964 (7).

Nous avons entrepris d'étudier les mécanismes cellulaires de l'action de l'hyperosmolarité sur la perméabilité à l'eau dans le but de préciser le mode d'action de l'hormone antidiurétique sur la vessie de grenouille.

Ce travail qui a permis de mettre en évidence de nombreux points communs entre l'accroissement de la perméabilité à l'eau en milieu hypertonique et la réponse physiologique à l'hormone antidiurétique (ADH) nous a conduit à postuler l'intervention, dans l'action de l'hypertonicité, d'étapes biochimiques également impliquées dans l'action de l'ADH.

Inversement, une réduction de la perméabilité transépithéliale à l'eau a été observée dans deux situations, aboutissant selon toute vraisemblance l'une et l'autre, à un abaissement de l'osmolarité des

cellules épithéliales : d'une part, la réduction de l'osmolarité du milieu séreux ; d'autre part, l'établissement d'un important flux net d'eau transépithélial comme on en observe au cours de la réponse hormonale, flux qui entraîne un gonflement des cellules épithéliales et l'apparition de nombreuses vacuoles dans le cytoplasme (24).

Tant cette inhibition du flux net d'eau sur lui-même que certaines informations d'ordre cinétique suggèrent l'existence d'un phénomène de rétroaction dans les mécanismes de contrôles de la perméabilité à l'eau. La perméabilité à l'eau de la vessie serait en quelque sorte régulée en fonction de l'osmolarité de l'assise épithéliale, cette régulation intervenant notamment au cours de la réponse physiologique à l'hormone antidiurétique.

CHAPITRE I

PERMEABILITE A L'EAU DE LA VESSIE DE GRENOUILLE

I.1 - RAPPELS MORPHOLOGIQUES

La vessie de grenouille se présente comme un sac bilobé dont la face muqueuse ou apicale, celle qui borde la lumière vésicale, est formée d'un épithélium unistratifié d'une épaisseur d'environ 10 μ. Sous cette couche se trouvent une lame basale puis un lacis de tissu conjonctif avec une musculature lisse. L'épaisseur de cette couche varie de 10 à 100 μ . Enfin, un endothélium très fin et très perméable (74) met la vessie en contact avec le milieu intérieur de la cavité péritonéale. Cette face de la vessie est appelée la face séreuse.

L'ultrastructure de ce tissu a été décrite par de nombreux auteurs : PAK POY et BENTLEY (97), PEACHEY et RASMUSSEN (101) ; CARASSO et al. (24), CHOI (27), JARD et al. (67). Les cellules épithéliales de la vessie ont la même apparence que celles des autres tissus, rien de leur structure ne peut être relié à leur capacité de changer leur perméabilité à l'eau (97). Plusieurs types cellulaires ont été mis en évidence (27). Ils pourraient jouer des rôles différents. Ainsi DI BONA et al.(41 , 43)ont suggéré que seules les cellules à granu-

lations, qui représentent 85 °/₀ de l'ensemble des cellules épithéliales, étaient le siège des modifications de perméabilité à l'eau.

Les cellules épithéliales sont liées entre elles par des barres terminales au niveau de leur pôle apical (85 , 101) ; leurs faces latérales présentent de nombreux desmosomes. En l'absence de différence de pression osmotique entre les deux faces de l'épithélium, les espaces intercellulaires, délimités par les membranes des faces latérales, sont très étroits : CARASSO et al. (25). Par contre, une dilatation importante de ces espaces ainsi qu'un gonflement cellulaire apparaissent lorsque la préparation est stimulée par l'hormone antidiurétique en présence d'une différence de pression osmotique (24 , 46 , 67). Ce gonflement cellulaire a souvent été considéré comme l'indication de l'accroissement de la perméabilité à l'eau de la membrane apicale sous l'action de l'hormone. Il est possible cependant que le passage de l'eau s'effectue au travers des barres terminales vers les espaces intercellulaires. Au reste, ces deux hypothèses sont compatibles avec la dilatation des espaces intercellulaires (67).

Quoi qu'il en soit, il est admis par l'ensemble des auteurs que la face apicale de la vessie est très peu perméable à l'eau et que c'est sur la perméabilité de cette zone externe de l'épithélium qu'agit l'ADH pour favoriser le passage de l'eau (40 , 59 , 75 , 76 , 77 , 82 , 86).

I.2 - MOUVEMENTS D'EAU A TRAVERS LA VESSIE

Il n'est pas possible de faire ici une analyse complète des travaux effectués sur la perméabilité à l'eau de la vessie d'amphibien. Nous nous contenterons simplement de résumer l'état actuel des connaissances nécessaires à la compréhension de ce travail.

Les mouvements d'eau à travers la vessie ont été mesurés de deux façons différentes :

1°- l'utilisation d'indicateurs nucléaires permet de déterminer les flux unidirectionnels et d'établir la valeur du coefficient de perméabilité de diffusion de la préparation. Ces mesures ont été effectuées à l'aide de D_2O ou d'eau tritiée (voir, par exemple, les travaux de HAYS et LEAF, 59).

2°- certaines techniques, volumétriques ou gravimétriques, offrent la possibilité de mesurer le flux net d'eau à travers la préparation et de déterminer son coefficient de perméabilité osmotique.

Il n'existe de flux net d'eau qu'en présence d'une différence de pression osmotique entre les deux côtés de la préparation, ce qui signifie que les mouvements d'eau à travers cette structure ont un caractère passif.

Ces deux coefficients (perméabilité de diffusion, perméabilité osmotique) sont accrus par l'hormone antidiurétique. HAYS et LEAF (59) mesurent des flux net d'eau 50 fois plus élevés en présence qu'en l'absence d'hormone. L'augmentation de la perméabilité diffusionnelle en présence d'ADH est beaucoup plus faible : 70 °/₀ environ. Il apparaît donc que la seule diffusion de l'eau à travers la préparation stimulée ne peut rendre compte du flux net d'eau. C'est la raison pour laquelle fut proposée l'hypothèse de l'existence de "pores" dans la membrane apicale et de l'écoulement de l'eau dans ces pores régi par la loi de POISEUILLE (59a , 59b). L'hormone agirait en augmentant soit le diamètre des pores, soit leur nombre.

Sans doute, la validité des mesures de la perméabilité de diffusion a été plusieurs fois mise en doute. On considère, dans ce type

d'expérience que la concentration de l'indicateur (D_2O , HTO) est homogène dans la totalité de chacun des compartiments, précurseur et produit. Cette simplification est probablement abusive, car il existe toujours au voisinage de la préparation des couches où l'indicateur n'est pas à la même concentration que dans les milieux d'incubation du fait du mauvais mélange de ces milieux. Ces "couches non agitées" jouent un rôle important dans la mesure de la perméabilité de diffusion, comme le montrent, par exemple, les mesures de l'épaisseur de ces couches sur les globules rouges : SHA' AFI et al. (115). DAINTY et HOUSE (33 , 34), HAYS et FRANKI (60 , 61) ont pu montrer que le coefficient apparent de diffusion est augmenté si l'on diminue l'épaisseur des couches non agitées par un mélange efficace des milieux d'incubation. Dans ce dernier cas, la perméabilité de diffusion augmente d'un facteur 10 sous l'action de l'ADH (60). Cependant rien ne permet d'affirmer que le flux d'eau à travers la vessie ne s'effectue que par un accroissement de la perméabilité diffusionnelle.

I.3 - TRANSPORT DE SODIUM

Une autre propriété importante de la vessie est sa capacité de transporter du Na^+ contre un gradient électrochimique. Ce transport s'effectue du compartiment muqueux vers le compartiment séreux. Il est également sous contrôle de l'hormone antidiurétique.

I.4 - MECANISME CELLULAIRE DE L'ACTION DE L'ADH

Dès 1921, BRUNN (20) montrait l'action des hormones neurohypophysaires sur la balance hydrique des amphibiens appelés à passer d'un habitat aquatique à un habitat terrestre. En 1952, EWER (53) observait que des extraits de neurohypophyses de mammifères augmentaient la réabsorption d'eau à travers la vessie. Ces extraits

contenaient entre autres substances une hormone antidiurétique responsable de l'effet observé. BENTLEY reprenait cette étude en 1958 (4). Il montrait que l'hormone agit lorsqu'elle est ajoutée au milieu d'incubation qui baigne la face séreuse de la vessie.

De nombreux travaux depuis lors ont été consacrés au mode d'action de l'ADH (9 , 28 , 75 , 94). Le mécanisme par lequel cette hormone accroît la perméabilité à l'eau de la face apicale de la vessie reste encore inconnu. Une étape est cependant bien établie depuis les travaux de HANDLER et ORLOFF (56 , 90 , 92 , 94). Cette étape fait intervenir le 3', 5'-AMP_c (AMP_c) comme intermédiaire de l'action de l'hormone. L'hormone agit sur une adénylcyclase qui accélère la production du nucléotide cyclique à partir d' ATP. C'est ce nucléotide qui est responsable à travers d'autres étapes de la modification de la perméabilité à l'eau de la vessie. Dans un certain nombre de tissus, l'AMP_c agit sur une kinase qu'elle active. Dès 1963, ORLOFF et HANDLER (91) montraient une activation de phosphorylase dans la vessie de crapaud sous l'action de l'ADH. On pouvait donc s'attendre à trouver dans ce tissu une certaine activité kinasique. Une kinase a été mise en évidence dans la vessie de grenouille par JARD et BASTIDE (66). Son rôle exact dans la chaîne des réactions qui entraîne l'accroissement de la perméabilité de l'épithélium vésical reste à définir. Il se pourrait, cependant, comme DOUSA et al. (47) le suggèrent au sujet de l'action de l'ADH sur la perméabilité à l'eau du canal collecteur du rein de mammifère, que cette kinase catalyse la phosphorylation des protéines membranaires responsables des variations de perméabilité.

I. 5 - ACTION DES MILIEUX HYPERTONIQUES

L'importance du flux net d'eau à travers une membrane est fonction de la différence de pression osmotique qui existe entre les solutions qui baignent ses deux faces.

Cependant, alors qu'il existe une relation linéaire pour les faibles gradients, la relation flux d'eau - différence de pression osmotique devient non-linéaire, soit lorsque cette dernière est très grande, soit lorsque, faible et constante, elle est établie à un niveau de pression osmotique élevé. Des actions comparables de l'hypertonicité ont été décrites dans de nombreux tissus (1, 19, 20, 32, 35-37, 106, 116, 122, 123).

Sur la vessie de grenouille, pour de faibles gradients (jusqu'à 200 mOsm) LEAF (75) observe une relation linéaire entre flux net d'eau et différence de pression osmotique. EARLEY et al. (48) montrent que des variations plus importantes du gradient osmotique entraînent des flux d'eau plus élevés que ceux prévus par une relation linéaire. BENTLEY (57 , 8) reproduit cette même observation et apporte trois précisions :

1°- Cette influence de l'hypertonicité se manifeste même à gradient osmotique constant.

2°- Elle est fonction du solute utilisé pour rendre les milieux d'incubation hypertoniques. Ainsi la perméabilité à l'eau de la vessie est accrue d'un facteur 3 lors de l'addition de 100 mOsm de sucrose aux milieux de survie, d'un facteur 5 avec 100 mOsm de NaCl. Par contre, l'urée à concentration égale ou même double n'entraîne pas d'accroissement de la perméabilité à l'eau.

3°- Le sens dans lequel est établi le gradient osmotique n'est pas indifférent. Pour un même gradient, le flux d'eau est plus important dans le sens muqueux-séreux que dans le sens séreux-muqueux. Cet auteur parle d'un éventuel effet rectificateur de la membrane (8).

Un travail plus récent de URAKABE et al. (119) décrit l'influence de différents solutes sur la perméabilité à l'eau et l'impor-

tance du sens dans lequel le gradient osmotique est établi. L'effet hydrosmotique de l'hypertonicité de la solution qui baigne la face séreuse de la vessie pourrait s'expliquer, d'après ces auteurs, par la rétraction des cellules qui entraînerait une altération de la perméabilité osmotique de la barrière limitante ; il ne leur semble pas nécessaire de faire intervenir des facteurs autres que des forces physiques.

Certaines observations sur l'influence de l'hyperosmolarité du milieu de survie sur la perméabilité de la peau de grenouille avaient amené USSING (120 , 123) aux mêmes conclusions.

Dans le même temps où nous réalisions ce travail, EGGENA et al.(49-51)suggéraient qu'un compartiment osmosensible était impliqué dans le mécanisme d'action de l'hypertonicité sur la perméabilité membranaire. Ils posaient également l'alternative de savoir si les processus mis en jeu par l'hypertonicité et l'ADH étaient totalement indépendants ou bien s'ils convergaient vers une voie finale commune.

La possibilité d'influencer la réponse hydrosmotique aux milieux hypertoniques par certains facteurs, entraînait ces auteurs à retenir la seconde possibilité et à suggérer que ces milieux hypertoniques agissent sur une étape postérieure à la formation d'AMP_c .

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

L'ensemble des techniques expérimentales et des conditionnements des animaux est décrit dans ce chapitre. On y a joint une étude critique des différents paramètres qui interviennent dans les mesures de variations de perméabilité à l'eau de la vessie d'amphibien.

II.1 - LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Ce travail a été réalisé sur la vessie urinaire de grenouille (Rana esculenta L.). Nous avons utilisé des grenouilles femelles de taille moyenne (entre 50 et 80 g de poids corporel). Elles proviennent généralement d'Europe centrale. Dès leur arrivée au laboratoire, elles sont maintenues dans l'eau courante à 2°C $\pm$ 2. Utilisées directement au sortir de la chambre froide dans certains cas, la plupart du temps, les grenouilles sont placées dans l'eau courante à 22°C, au moins huit jours avant l'expérience. Aucune nourriture ne leur est donnée pendant leur séjour au laboratoire.

II.2 - LE PRELEVEMENT DE LA VESSIE

Au moment de l'expérience, la grenouille est décapitée et la moelle épinière détruite, puis une incision médiane de la paroi abdominale est pratiquée.

Un cathéter est introduit par le cloaque et la vessie est emplie de solution de Ringer jusqu'à ce qu'elle soit légèrement distendue.

La procédure utilisée ensuite dépend de la technique de mesure qui sera employée. La technique la plus communément utilisée pour mesurer les flux net d'eau à travers la vessie de grenouille est une technique gravimétrique. Elle a été décrite par BENTLEY (7) et consiste à former avec la vessie un sac que l'on pèse régulièrement. Toute perte ou gain de poids correspond à un flux net d'eau à travers la préparation.

Si on utilise une technique volumétrique (BOURGUET et JARD) (13), on place cinq ou six ligatures tout autour de la vessie de manière à contrôler sa rétraction lors de son incision. A l'aide de ces ligatures, la vessie est placée à la manière d'un diaphragme entre deux chambres en plexiglas (Figure 1) ; sa face séreuse est sous-tendue par une toile de nylon (diamètre des mailles 125 μ).

Chaque préparation recouvre deux canaux indépendants, d'une section utile de 1 cm^2, ce qui permet d'étudier simultanément le comportement de deux fragments de la même vessie. Le volume de la solution qui baigne la face muqueuse de la vessie est de 6 ml, le volume de la solution de Ringer qui baigne sa face séreuse est de 2 ou 3 ml suivant les expériences.

II. 3 - LA MESURE VOLUMETRIQUE DU FLUX NET D'EAU

La mesure du flux net d'eau est une mesure volumétrique basée sur le fait que le volume de solution dans le compartiment muqueux est maintenu constant, tout passage d'eau de ce compartiment vers le milieu séreux étant automatiquement compensé par une réinjection d'eau. Une légère pression hydrostatique (15 cm d'eau) applique la vessie contre la toile de nylon, ce qui permet d'éviter toute variation de volume de la

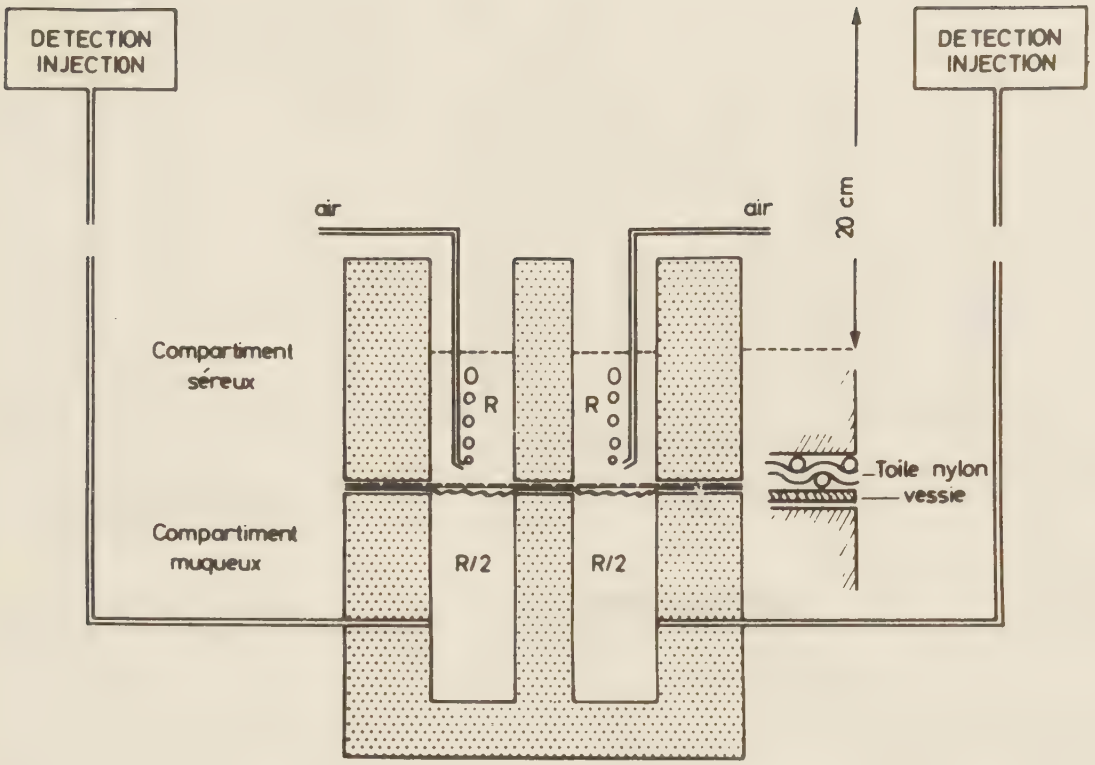


Figure 1

Chambre de mesure du flux net d'eau. Les compartiments séreux sont emplis avec une solution de Ringer (R). Les compartiments muqueux avec une solution de Ringer diluée, d'un facteur deux dans le cas présent (R/2).
D'après JARD et coll. - Journal de Microscopie, 1966 (65).

chambre muqueuse due à un mouvement de la vessie. Le volume réinjecté est mesuré grâce au couplage de la seringue micrométrique de réinjection à un potentiomètre. Toutes les minutes un arrêt de la réinjection permet la remise à zéro du potentiomètre. L'enregistrement du flux se présente comme une suite de traits dont la hauteur est proportionnelle au volume d'eau réinjecté pendant chaque minute (Figure 3). La sensibilité de la

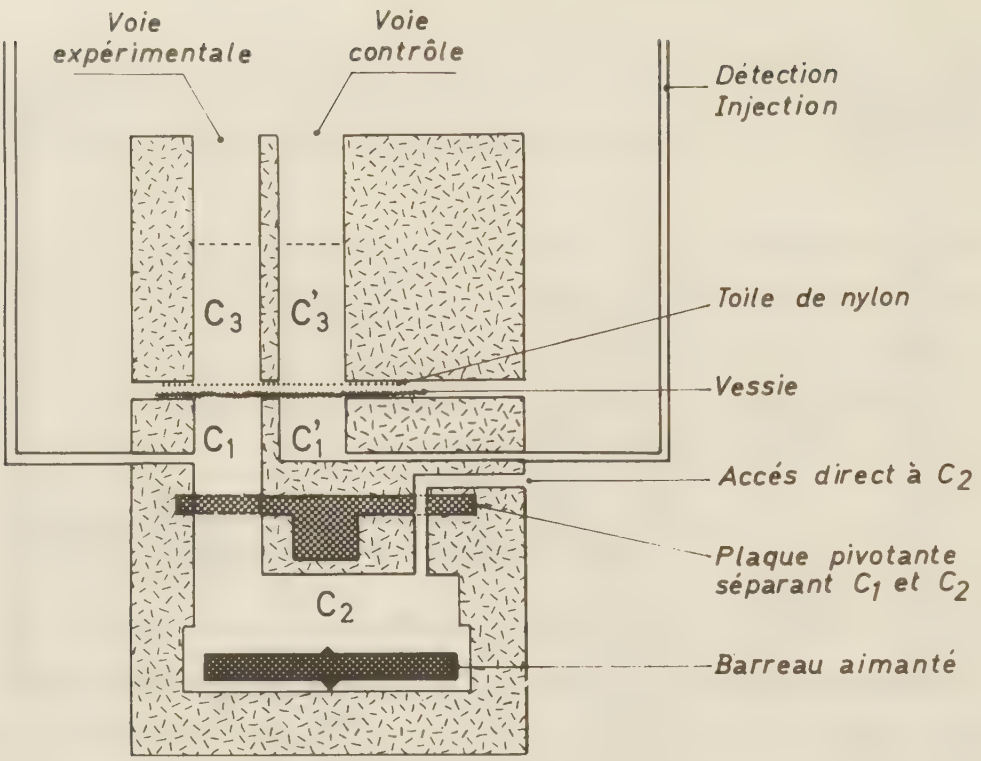


Figure 2

Chambre de mesure permettant un accès au compartiment muqueux. Voir la description dans le texte.

technique est telle que toute variation de volume, et donc tout flux net d'eau de plus de 0, 05 µl est détecté. L'erreur est non cumulative.

Les valeurs obtenues pour le flux de base avec notre technique (0, 05 à 0, 2 $\mu l . min^{-1} . cm^{-2}$) sont identiques à celles qu'observent les utilisateurs de la technique gravimétrique de BENTLEY (4).

L'utilisation de notre technique rend cependant peu facile l'accès au compartiment muqueux en cours de mesure. Dans le but de pallier cette carence, un appareil a été modifié (Figure 2), de telle sorte qu'une des voies de mesure ait un compartiment muqueux divisé en deux

parties : une chambre supérieure (C1) de faible volume (1 ml) directement en contact avec la face muqueuse de la préparation et une chambre inférieure (C2) beaucoup plus grande (30 ml) à laquelle on peut avoir accès en cours d'expérience et qui peut être mise en communication avec la chambre C1. Un changement pratiquement complet du contenu de cette dernière peut être ainsi réalisé (un agitateur magnétique assure un bon mélange des deux chambres en moins d'une minute). Un artefact apparaît à l'ouverture et à la fermeture de la communication entre les chambres. Il est très facilement dissociable des effets propres aux changements de milieux observés.

II.4 - AUTRES MESURES

Dans quelques expériences des mesures du potentiel transépithélial et du courant de court-circuit ont été effectuées. La technique de mesure du courant est celle proposée par USSING et ZERAHN (121), automatisée par MOREL et al. (81 , 88).

II.5 - MILIEUX DE SURVIE ET PRODUITS UTILISES

Dans les conditions normales, la chambre séreuse est emplie d'une solution de Ringer (Na^+ 114,5 mEq/l ; K^+ 5 mEq/l ; Ca^{++} 2 mEq/l ; Cl^- 119 mEq/l ; HCO_3^- 2,5 mEq/l). La chambre muqueuse contient en général une solution hypotonique appelée soit Ringer/20 , R/3 ou R/2, obtenue par abaissement de la concentration du chlorure de sodium. La composition du R/20, par exemple, est la suivante : Na^+ 7,5 mEq/l ; K^+ 5 mEq/l ; Ca^{++} 2 mEq/l ; Cl^- 12 mEq/l ; HCO_3^- 2,5 mEq/l. L'élévation de la pression osmotique du milieu séreux est réalisée par addition soit de mannitol (110 ou 220 mOsm/l), de NaCl (115 mM/l) ou d'urée (220 , 500 ou 1 000 mOsm/l). Dans certaines expériences, l'élévation de la pression

osmotique a été effectuée par addition de solute aux solutions muqueuse et séreuse de manière à maintenir constante la différence de pression osmotique entre les deux solutions. D'autres conditions de survie plus particulières, seront décrites au cours de l'exposé des résultats.

Seul le milieu baignant la face séreuse de la préparation est oxygéné par barbotage d'air.

La plupart des expériences ont été réalisées à température ambiante. Quelques mesures ont été cependant effectuées à d'autres températures. Ceci a nécessité le maintien des chambres de mesure dans un bain dont la température était contrôlée avec une précision de $\pm$ 0,1°C afin d'éviter toute variation du volume du compartiment muqueux.

Plusieurs substances connues pour modifier la perméabilité à l'eau de la vessie des amphibiens, ont été utilisées. Les hormones neurohypophysaires employées provenaient des laboratoires SANDOZ ; il s'agissait de produits de synthèse, soit l'ocytocine (Syntocinon), soit l'arginine vasotocine. Le 3',5'-AMP_c a été fourni par les Laboratoires Schwartz Bioresearch Inc. La théophylline provenait de la Société SERLABO. Les préparations commerciales de noradrénaline (Levophed), de phentolamine (Régitine), d'isoproterenol (Isuprel) et de propranolol (Propanolol) ont été utilisées sans autre purification. Le dichloroisoproterenol nous a été fourni gracieusement par les Laboratoires EXPANDIA (Paris) et la prostaglandine E_1 (PGE_1) par le Dr. J.E. PIKE, Upjohn Cy.

Dans tous les cas le pH des milieux de survie a été ajusté à une valeur de 8,1.

II. 6 - PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

Dans la plus grande partie de nos expériences, chaque préparation couvre deux voies de mesure simultanées, ce qui permet de comparer pour chaque vessie un fragment-contrôle et un fragment-expérimental. Toutefois, nous avons souvent observé des différences de sensibilité entre les deux parties d'une même vessie. Il est possible que des différences dans le degré de contraction des deux fragments soit à l'origine de cette assymétrie, mais ce facteur est difficilement contrôlable. Aussi, dans le but de nous assurer un témoin plus fidèle, nous avons, lorsque les effets mesurés étaient réversibles, encadré la période expérimentale proprement dite par des périodes contrôles. Nous avons opéré de la même façon lorsque nous n'avons pu obtenir qu'un seul fragment par préparation. Cet encadrement de la partie proprement expérimentale nous a permis de tenir compte dans les calculs de l'évolution de la sensibilité de la préparation au cours du temps (la durée d'une expérience varie de 4 à 8 heures). Les variations de sensibilité observées semblent davantage liées à la durée de la survie qu'au fait que la préparation soit stimulée ou non plusieurs fois par l'hormone. Par contre, il semble que des stimulations répétées de la vessie par les milieux hypertoniques sensibilisent cette dernière.

II. 7 - EXPRESSION DES RESULTATS

En ce qui concerne la réponse hydrosmotique à l'hormone la cinétique de réponse est, pour une température constante, une donnée remarquablement peu variable, quelles que soient l'intensité du flux observée au maximum de la réponse et la concentration d'hormone utilisée.

Le programme standard de calcul a donc été écrit de manière à obtenir, pour chaque minute, outre le flux moyen

(moyenne des flux individuels) et l'accroissement moyen du flux (moyenne des accroissements individuels), une expression normalisée : le pourcentage moyen des accroissements du flux (moyenne des accroissements individuels exprimés en pour cent de l'accroissement maximum observé au cours de la réponse considérée).

Dans le cas où seule la cinétique d'accroissement du flux était analysée, les valeurs postérieures au maximum de la réponse ont été considérées arbitrairement comme égales à 100 °/₀ de ce maximum.

II. 8 - CONDITIONNEMENT DES ANIMAUX

La grande variabilité des réponses hydrosmotiques observée d'une préparation à l'autre rend nécessaire une standardisation aussi précise que possible des conditions expérimentales. Des facteurs saisonniers ont été invoqués par de nombreux auteurs (9 , 58). Leur influence a d'ailleurs été démontrée chez les amphibiens, par exemple sur la production de corticostéroïdes (26) sur l'excrétion d'urée et sur les sources de métabolites utilisés dans la production de l'ATP (69). Nous avons essayé d'atténuer leurs effets par une adaptation prolongée des animaux à un milieu et à des températures constantes (eau courante, à 2°C ou 22°C).

II. 9 - INFLUENCE DE LA PRESSION HYDROSTATIQUE

A la différence de la technique gravimétrique décrite par BENTLEY (4), la technique de mesure que nous avons utilisée fait intervenir une légère pression hydrostatique sur la vessie. Cette différence de pression est compatible avec la survie de la préparation : le potentiel transépithélial se maintient à une valeur élevée, le flux d'eau

de base reste inchangé pendant plus de huit heures (Figure 3). De plus, cette pression hydrostatique est négligeable par rapport aux différences de pression osmotique mises en oeuvre. Dans quelques cas, nous avons modifié la pression hydrostatique exercée sur la préparation. Les raisons et l'influence de cette modification seront développées avec les résultats.

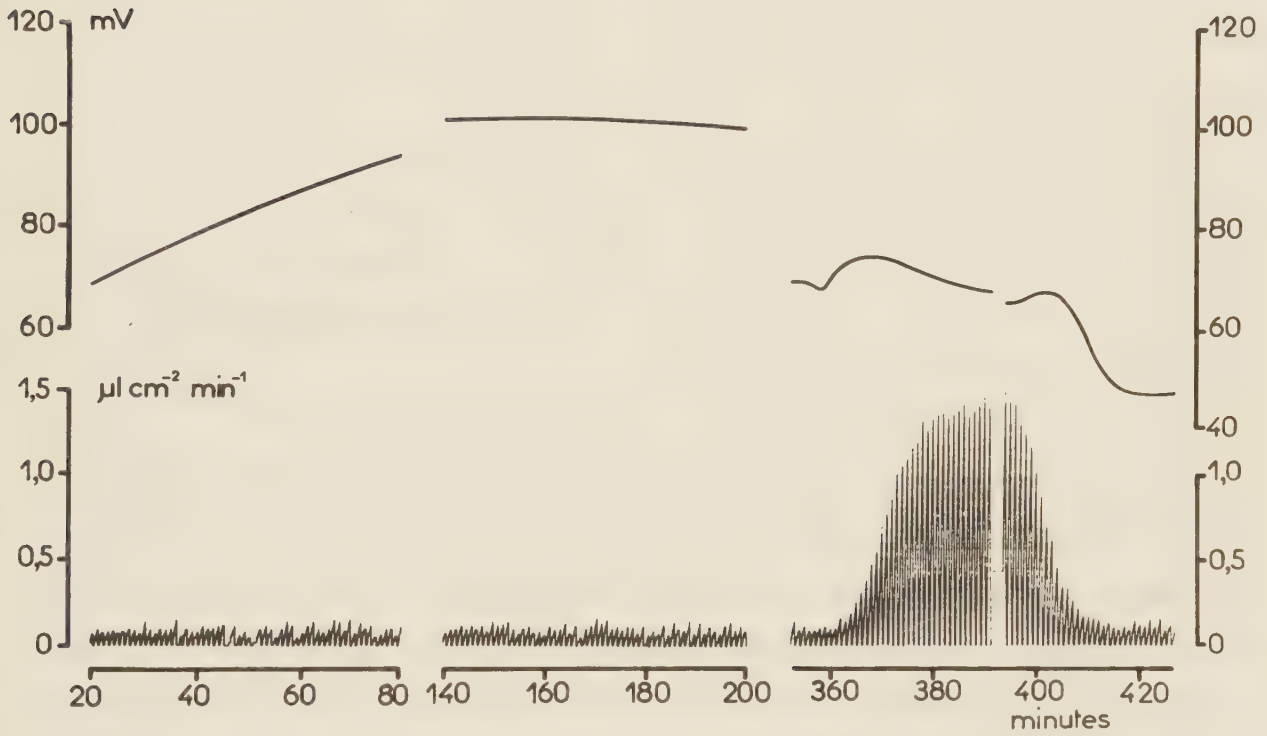


Figure 3

Enregistrement simultané de l'évolution du potentiel transépithélial et du flux net d'eau sur une préparation maintenue en survie pendant 7 heures. A la minute 356, la vessie est stimulée par l'ocytocine.

II.10 - ETUDE MORPHOLOGIQUE

En relation avec les mesures de perméabilité, une étude morphologique a été réalisée par les techniques classiques. Les vessies sont montées entre les chambres de mesure. Au repos une solution de

Ringer baigne la face séreuse, et une solution de Ringer dont la concentration de chlorure de sodium est abaissée de moitié (Ringer/2) baigne la face muqueuse. Ces conditions de mesure permettent d'envisager la fixation de la préparation par la face apicale, ce qui est nécessaire lorsque le milieu séreux est hypertonique. En effet, la fixation par la face séreuse avec un fixateur hypertonique présente un inconvénient : elle entraîne par elle-même des modifications importantes de l'ultrastructure du tissu. Lorsque le milieu séreux est rendu hypertonique, la fixation est donc effectuée par la face muqueuse avec une solution de glutaraldéhyde à 1 °/₀ dans un tampon cacodylate à 0, 025 M (pH 7, 4) pendant au moins 30 minutes. La pression osmotique du fixateur (mesurée par l'abaissement du point de congélation) est la même que celle du Ringer/2 ; il n'y a donc pas de forte variation de pression osmotique au moment de la fixation. Le flux net d'eau à travers la préparation est mesuré pendant la durée de la fixation.

Lorsque le milieu muqueux est rendu hypertonique : une solution de Ringer baigne les deux côtés de la préparation et 220 mOsm de mannitol sont ajoutées du côté muqueux, la fixation est effectuée par la face séreuse avec une solution de glutaraldéhyde à 1 °/₀ dans du tampon cacodylate à 0. 05 M (pH 7, 4) pendant trente minutes. Le gradient de pression osmotique est là encore préservé.

Les préparations ainsi fixées sont post-fixées au tétroxyde d'osmium et déshydratées pour l'observation en microscopie électronique.

CHAPITRE III

ULTRASTRUCTURE DE L'EPITHELIUM DE LA VESSIE DE GRENOUILLE EN PRESENCE DE MILIEUX HYPERTONIQUES

III.1 - INTRODUCTION

Une action mécanique des milieux hypertoniques sur l'assise épithéliale de la vessie de grenouille pourrait entraîner des modifications ultrastructurales importantes, et être à l'origine des variations de perméabilité à l'eau de la préparation. Nous avons donc tenu à nous assurer que l'ultrastructure de l'épithélium n'est pas grossièrement altérée par l'hyperosmolarité du milieu. Nous avons observé en microscopie optique et électronique cette structure dans diverses conditions expérimentales (113).

Dans ces expériences, nous avons rendu hypertonique tantôt le milieu séreux, tantôt le milieu muqueux par addition de mannitol (220 mOsm) et nous avons fixé la vessie dans trois conditions.

Dans la première série d'expériences, la préparation est fixée cinq minutes après l'addition du mannitol au milieu séreux. Dans cette situation, comme le montre la Figure 4, A , la réponse hydrosmotique ne s'est pas encore développée ; nous observons seulement un accroissement de flux de base qui correspond à l'augmentation du gradient osmotique.

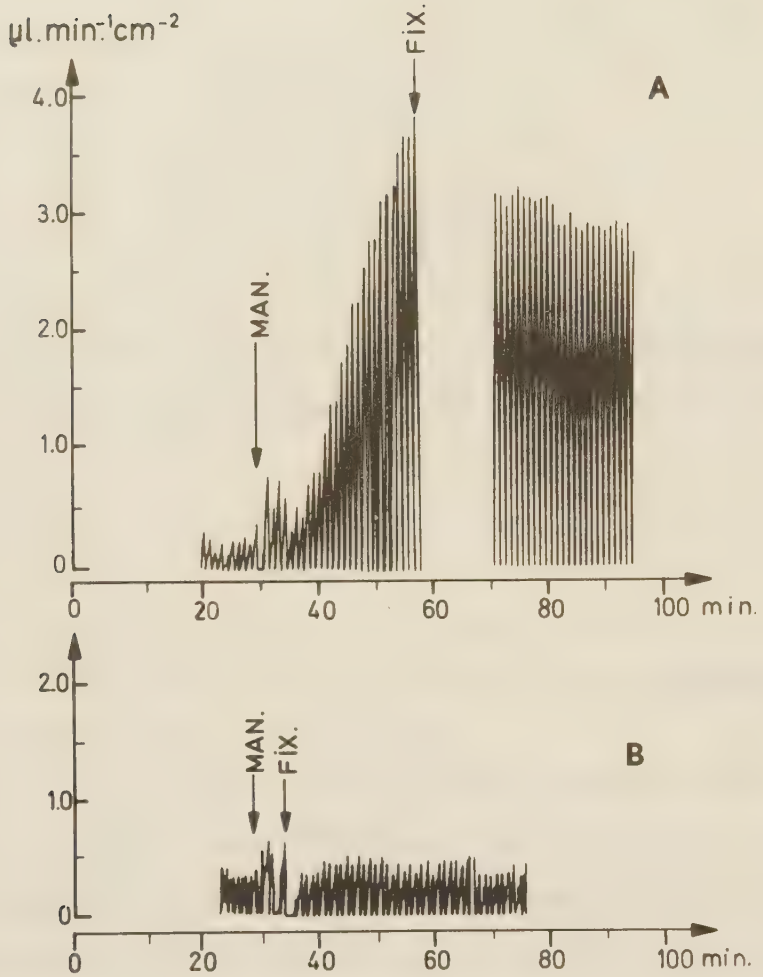


Figure 4

Enregistrement du flux net d'eau à travers deux fragments de la même vessie stimulés par addition de mannitol (220 mOsm) au milieu séreux. (MAN.).

A. Fragment fixé au maximum de la réponse (FIX).

B. Fragment fixé cinq minutes après l'addition du mannitol (FIX).

Le flux net d'eau est également mesuré en présence du fixateur.

Dans la deuxième série d'expériences, la préparation est fixée lorsque le flux net d'eau a atteint sa valeur maximale en réponse à l'addition du mannitol du côté séreux (Figure 4, B).

Dans la troisième série d'expériences, les vessies sont en contact par leurs côtés séreux et muqueux avec une solution de Ringer et le mannitol (220 mOsm) est ajouté au milieu qui baigne la face muqueuse. La fixation a lieu une heure après l'établissement du gradient.

III. 2 - FIXATION AVANT LE DEVELOPPEMENT DE LA REPONSE AU MANNITOL

Dans les préparations fixées, cinq minutes après l'addition du mannitol au bain séreux, les cellules de l'assise épithéliale de la vessie sont rétractées, leur cytoplasme est dense et exempt de vacuoles et les espaces intercellulaires sont fortement dilatés (Planche I, b ; Planche II, a) comparativement au fragment de la même vessie au repos (Planche I, a).

III. 3 - FIXATION AU MAXIMUM DE LA REPONSE

Dans la série expérimentale où les vessies sont fixées au maximum de la réponse aux milieux hypertoniques séreux (Figure 4B), les cellules sont encore rétractées ; nous observons peu de vacuoles dans le cytoplasme mais les espaces intercellulaires sont très fortement dilatés (Planche I, c ; Planche II, b). Les desmosomes ne sont plus visibles et les cellules ne sont en contact les unes avec les autres que par les barres terminales (Planche III, a). Nous avons comparé ces fragments de vessie à d'autres fragments stimulés par l'ocytocine (Planche II, c). Dans ce cas, où cependant le flux était de même amplitude, nous avons observé, comme cela a été décrit à plusieurs reprises (24 , 25 , 42 , 43 , 101) que les espaces étaient en général moins dilatés, que les cellules étaient gonflées et présentaient de nombreuses vacuoles.

PLANCHE I

Vue d'ensemble en microscopie photonique de préparations témoins et traitées (fixation par la glutaraldéhyde, post-fixation avec OsO_4. Les coupes sont colorées au bleu de toluidine). X 1 300.

I, a - Fragment de vessie contrôle. Les espaces intercellulaires sont collabés.

I, b - Cinq minutes après l'addition de mannitol au bain séreux. Observer l'élargissement des espaces intercellulaires (flèches).

I, c - Au maximum de la réponse à l'hypertonicité séreuse les espaces intercellulaires sont dilatés (flèche).

I, d - Une heure après addition de mannitol à la solution de Ringer baignant la face muqueuse. Noter les grosses vacuoles dans le cytoplasme. Les espaces intercellulaires sont fermés.

Ep : épithélium.

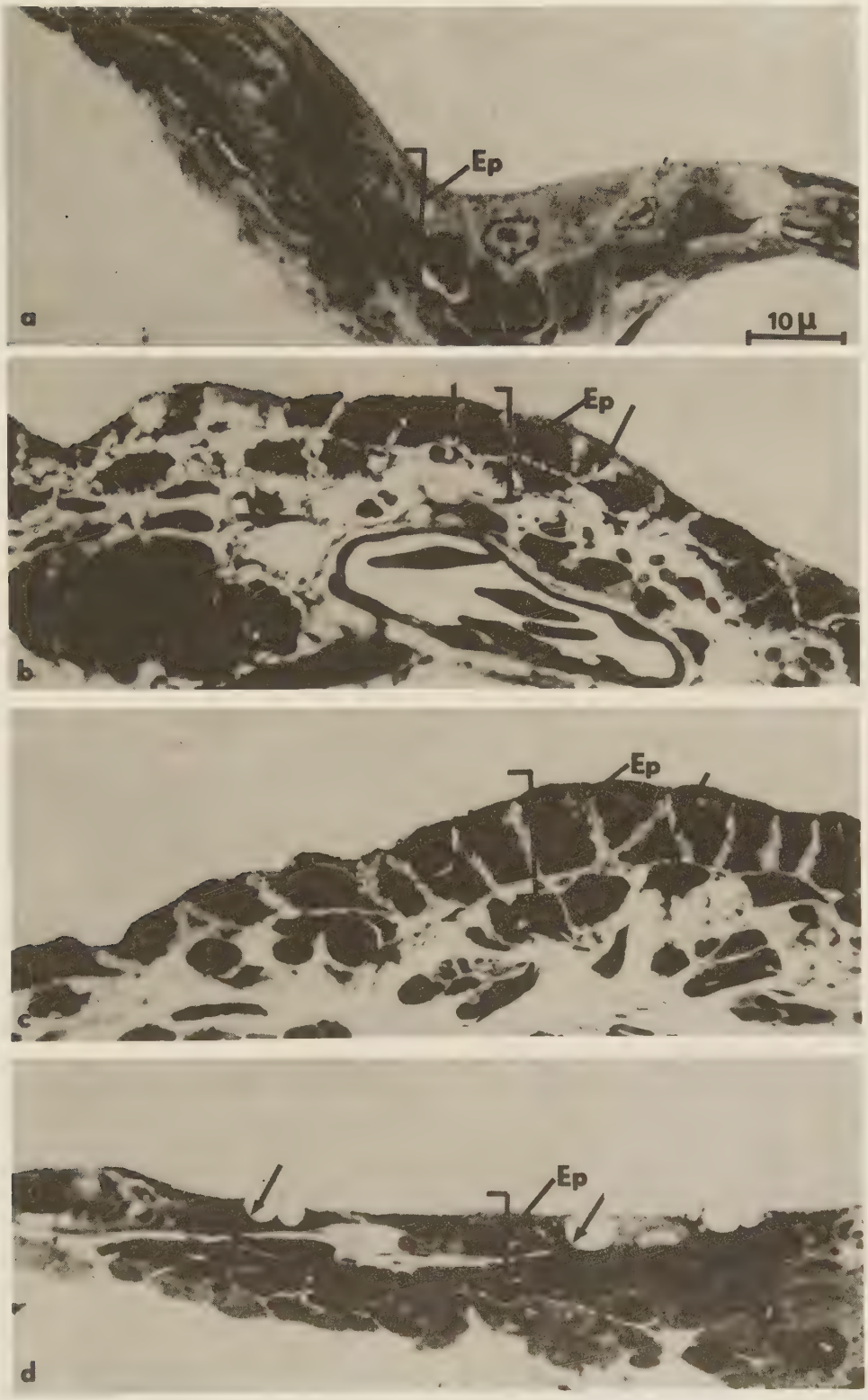


PLANCHE I

PLANCHE II

Epithélium de la vessie de grenouille dans différents états (fixation par la glutaraldéhyde, post-fixation par OsO_4). Observation en microscopie électronique. X 7500.

II, a - Cinq minutes après addition de mannitol au compartiment séreux.

II, b - Lorsque la réponse à l'hypertonicité séreuse est développée.

II, a et b - Les espaces intercellulaires (e i) sont très dilatés et les cellules sont rétractées.

II, c - Fragment de vessie stimulé par l'ocytocine $4,4.10^{-8}$ M. Noter que les cellules sont gonflées et les espaces intercellulaires (e i) sont ouverts.

II, d - Après addition de mannitol au côté muqueux. Les espaces intercellulaires sont fermés (flèches).

v = vacuoles.

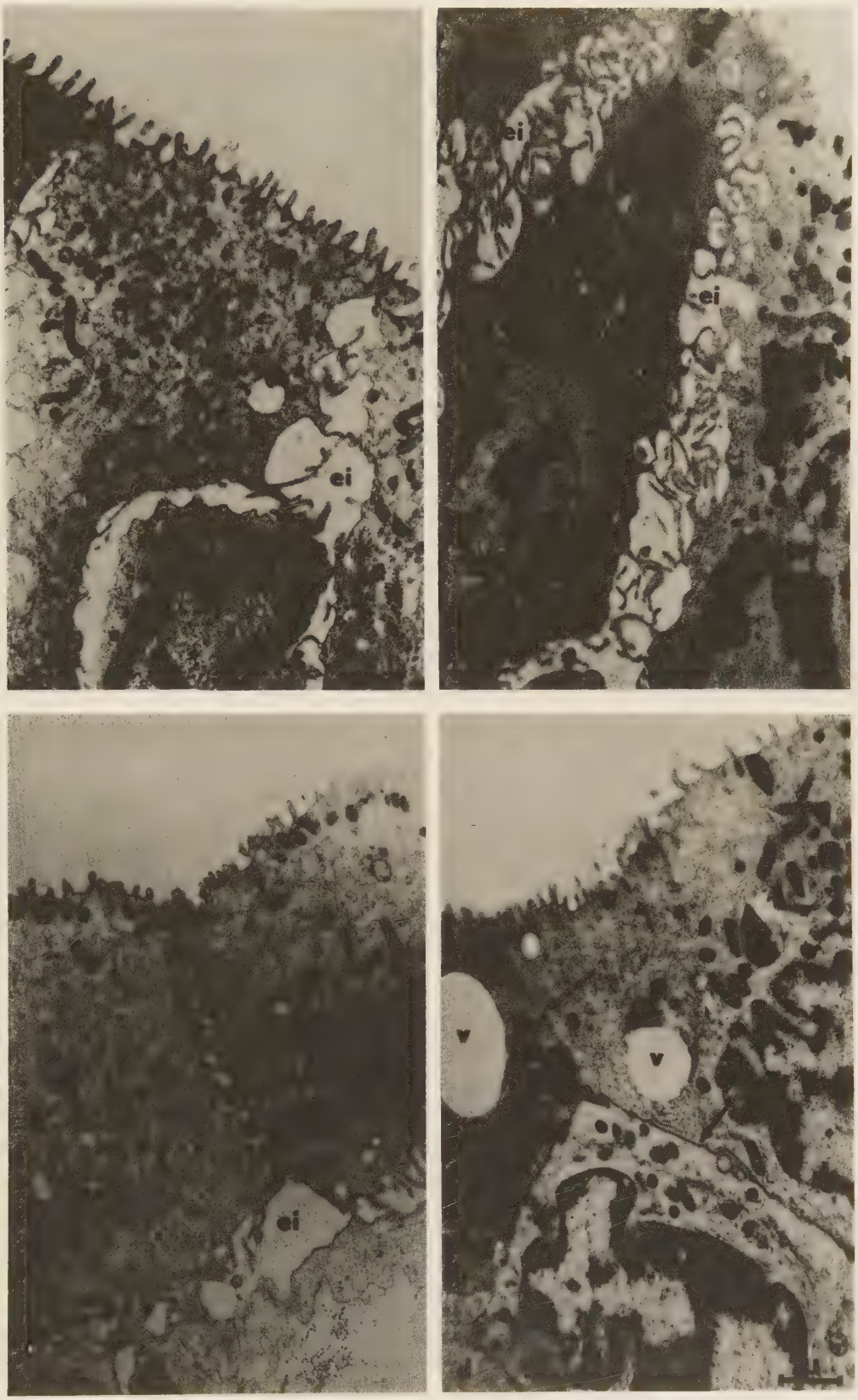


PLANCHE II

PLANCHE III

Vessies traitées par le mannitol. Espaces intercellulaires. X 50 000.

III, a - Hypertonicité séreuse : les espaces intercellulaires (e i) sont dilatés et les barres terminales (b t) sont fermées.

III, b - Hypertonicité muqueuse : les espaces intercellulaires sont clos. Noter la vésicule dans la région de la barre terminale (flèche).

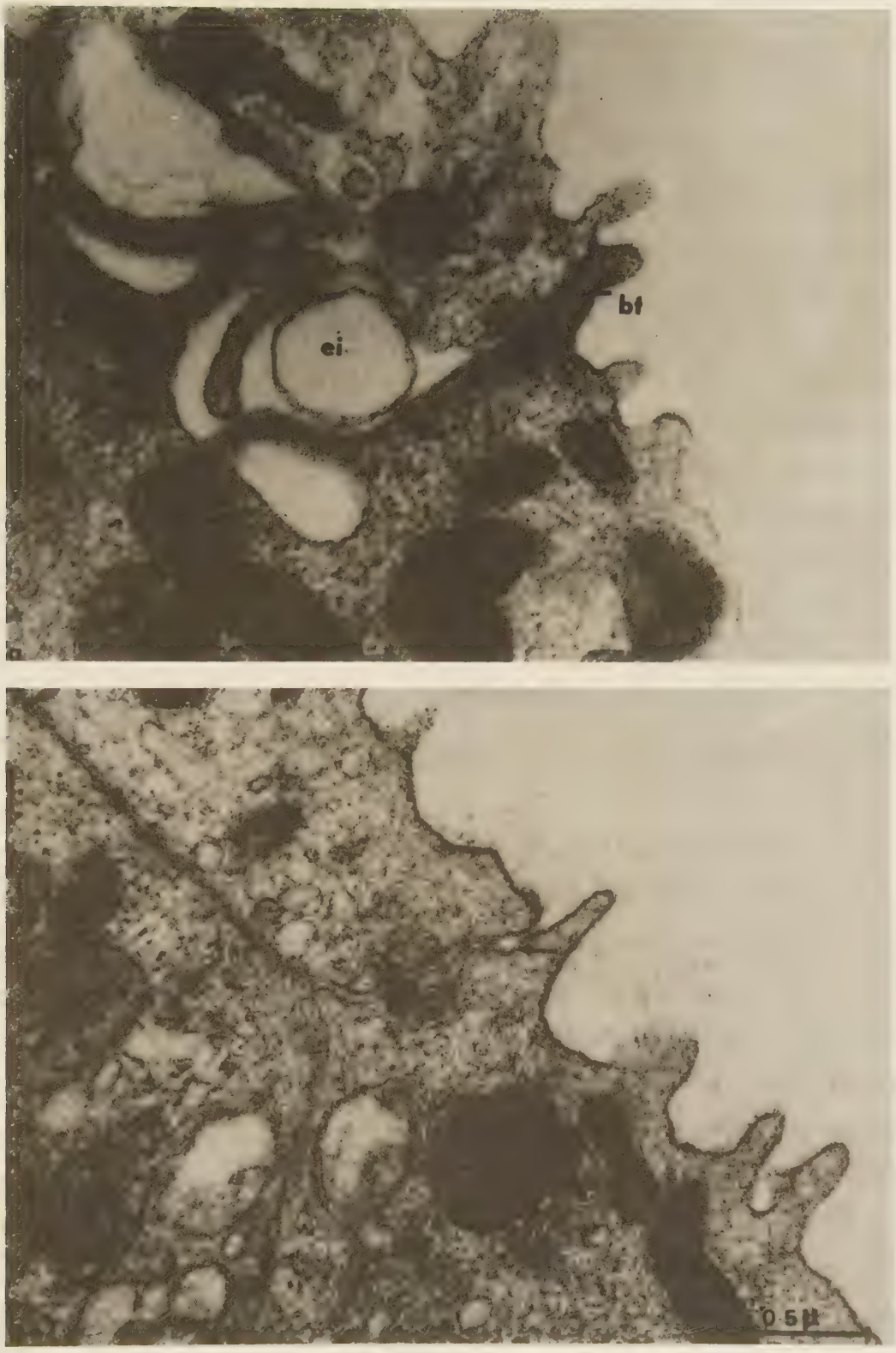


PLANCHE III

III. 4 - FIXATION LORSQUE LE COMPARTIMENT MUQUEUX EST HYPERTONIQUE

Nous avons enfin examiné la structure de la vessie lorsque le milieu muqueux seul, est rendu hypertonique et le flux net est orienté dans le sens séreux-muqueux. Dans ces conditions, nous avons toujours observé des flux plus faibles et des temps de réponse plus longs (Figure 11) que ceux observés dans des conditions comparables alors que le flux est orienté dans le sens muqueux-séreux. Parallèlement, l'assise épithéliale est profondément altérée : de très grosses vacuoles apparaissent dans le cytoplasme, les espaces intercellulaires sont collabés et de petites vacuoles sont observées au niveau des barres terminales (Planche III, b). Cet état de la vessie, décrit également par DI BONA (45), diffère de celui observé en hypertonicité séreuse et suggère que d'autres mécanismes sont en jeu dans ce cas.

III. 5 - PERMEABILITE AUX GROSSES MOLECULES

Nos observations de l'ultrastructure de la vessie de grenouille perméabilisée par l'hypertonicité séreuse, montrent que la préparation présente une bonne intégrité. A la différence de l'hypertonicité muqueuse qui altère les barres terminales et crée ainsi une voie de passage prédominante pour l'eau et les solutes (ce qui a été montré sur la peau de grenouille (52 , 122 , 124-126), l'hypertonicité séreuse n'entraîne pas de modification des barres terminales bien qu'il y ait une dilatation extrême des espaces intercellulaires et un flux d'eau très important. Nous nous sommes assurés de l'imperméabilité des barres terminales à l'aide d'indicateurs nucléaires. Nous avons ajouté de l'inuline 3-H au milieu muqueux et mesuré son apparition dans le compartiment séreux. Aucun flux d'inuline n'est détectable ni avant, ni pendant la stimulation par 220 mOsm de mannitol ajoutées au côté séreux.

Nous avons répété ces expériences avec du mannitol C^{14} ; il n'y a pas non plus de passage accru de mannitol marqué lors de l'addition de 220 mOsm de mannitol. Le coefficient de perméabilité n'est pas modifié, il reste très bas : $0,87.10^{-7}$ cm/sec.

III. 6 - CONCLUSION

A la lumière de ces résultats, il s'avère que si des variations de la structure de l'assise épithéliale surviennent quand la vessie est placée dans des milieux hypertoniques, il semble bien que la barrière de perméabilité reste intacte et que les barres terminales entre les cellules jouent toujours leur rôle. La comparaison des réponses hydrosmotiques de la vessie aux stimulations par l'hormone et par les milieux hypertoniques paraît donc possible, sans oublier toutefois que dans un cas les cellules sont gonflées et dans l'autre fortement rétractées. Cet état différent des cellules épithéliales n'entraîne pas systématiquement, nous l'avons vu, une perméabilité moins sélective de la barrière apicale.

CHAPITRE IV

ACTION DES MILIEUX HYPERTONIQUES SUR LA PERMEABILITE A L'EAU

IV.1 - INTRODUCTION

L'accroissement du flux net d'eau transépithélial et la diminution simultanée du courant de court-circuit sous l'action des milieux hypertoniques, déjà rapportées par BENTLEY (1964), (7), ont été également observés au cours de ce travail. A l'inverse de l'ocytocine qui accroît ces deux paramètres, les milieux hypertoniques exercent sur eux des effets opposés. La Figure 5 en donne une illustration. Elle représente un enregistrement simultané du courant de court-circuit et du flux net d'eau à travers le même fragment de vessie soumis successivement aux deux stimuli. Les deux réponses ne semblent donc pas nécessairement liées et, comme le suggèrent en outre leurs cinétiques très différentes, il est peu probable qu'elles relèvent d'un même mécanisme. De nombreux arguments ont d'ailleurs été avancés en faveur d'une telle dissociation (2 , 12 , 15 , 102 , 105 , 108).

Nous avons centré notre étude sur un seul de ces phénomènes, les variations du flux net d'eau (109 , 110 , 112).

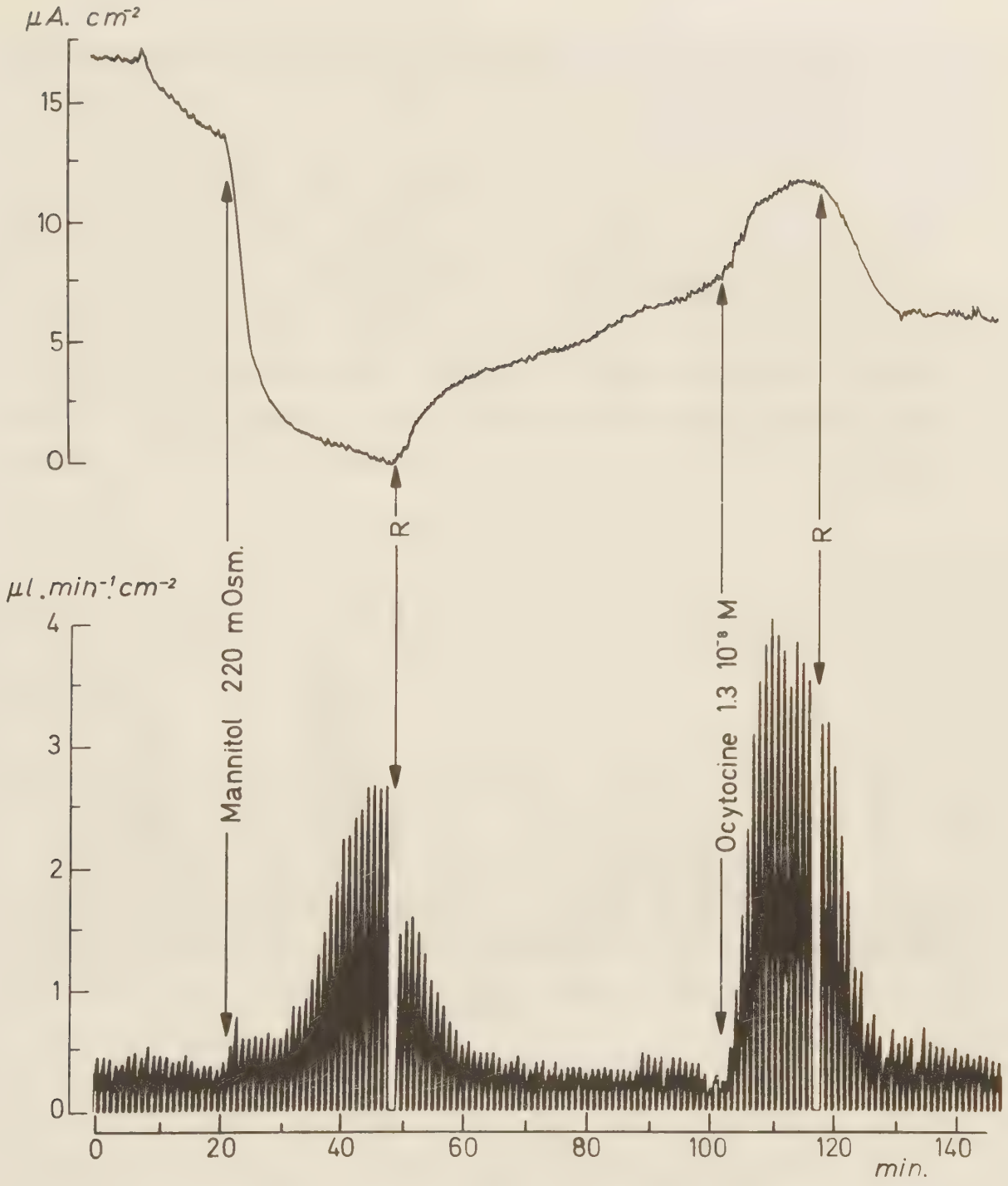


Figure 5

Influence du mannitol et de l'ocytocine sur le flux net d'eau et le courant de court-circuit à travers la vessie de Rana esculenta. Le mannitol et l'ocytocine sont ajoutés au milieu séreux.

IV.2 - DESCRIPTION DE LA CINETIQUE DE REPONSE AUX MILIEUX HYPERTONIQUES

La Figure 6 montre un enregistrement du flux net d'eau à travers la même préparation incubée en Ringer/Ringer/20 puis soumise à trois stimuli différents. En A : les milieux baignant les faces muqueuse et séreuse sont rendus hypertoniques (S) par addition de 220 mOsm de mannitol. Il persiste donc entre les deux faces de la préparation le même gradient de pression osmotique qu'avant la stimulation.

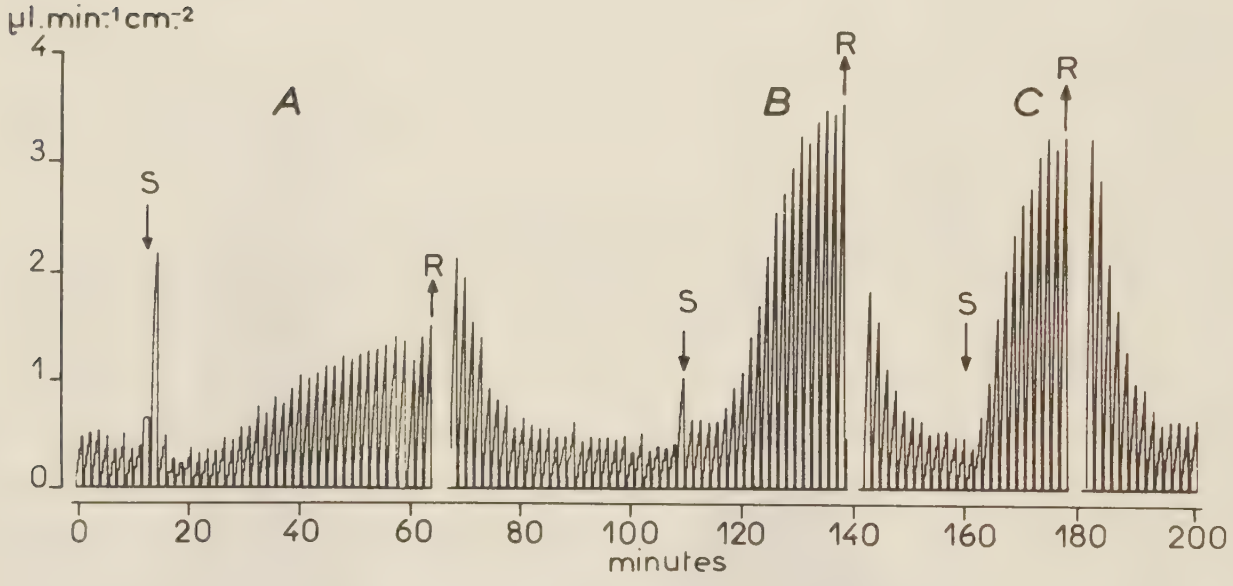


Figure 6

Evolution du flux net d'eau en réponse à :

A. l'addition de 220 mOsm de mannitol aux solutions baignant les deux faces de la préparation.

S = stimulation ; R = rinçage.

B. l'addition de 220 mOsm de mannitol au compartiment séreux seul.

C. l'addition de 10^{-8} M d'ocytocine au milieu séreux.

En B : la même concentration de mannitol est ajoutée au seul milieu séreux. En C : la préparation est stimulée par l'ocytocine 10^{-8} M. Dans les trois cas nous observons un accroissement du flux net d'eau. Il est moins élevé lorsque la pression osmotique est accrue des deux côtés de la préparation, la différence de pression osmotique entre les deux compartiments restant constante. Il est proportionnellement plus important lorsque cette différence de pression osmotique est accrue de 220 mOsm. Dans ce cas particulier, le flux atteint une valeur maximale supérieure à celle observée, immédiatement après, en réponse à une concentration élevée d'ocytocine (10^{-8} M, concentration habituellement maximale).

Outre l'artefact observé au moment de la stimulation, la courbe de réponse en B présente une allure caractéristique en deux phases :

a) Une première phase où le flux présente un accroissement consécutif à l'augmentation de la différence de pression osmotique transépithéliale. Cet accroissement apparaît immédiatement, tout comme apparaîtra immédiatement la réduction du flux consécutive au remplacement de la solution hypertonique séreuse par une solution de Ringer normale (R). Cette première phase correspond également au temps de latence de la variation tardive du flux.

b) Un accroissement tardif du flux net d'eau, dont la cinétique sigmoïde n'est pas sans rappeler la variation du flux net d'eau entraîné par l'hormone (C).

Les rôles respectifs de la variation du gradient osmotique transépithélial et de la variation de pression osmotique du milieu séreux ont été étudiés dans une série d'expériences où les préparations ont été stimulées en ajoutant, d'une part, au compartiment séreux, et d'autre part,

aux deux milieux d'incubation 220 mOsm de mannitol (Figure 7). Il apparaît clairement que la différence de gradient osmotique transépithélial peut, à elle seule, rendre compte des différences de flux observées.

Dans la suite de nos expériences, à l'exception d'une série expérimentale décrite plus loin, l'addition du solute a toujours été effectuée seulement du côté séreux.

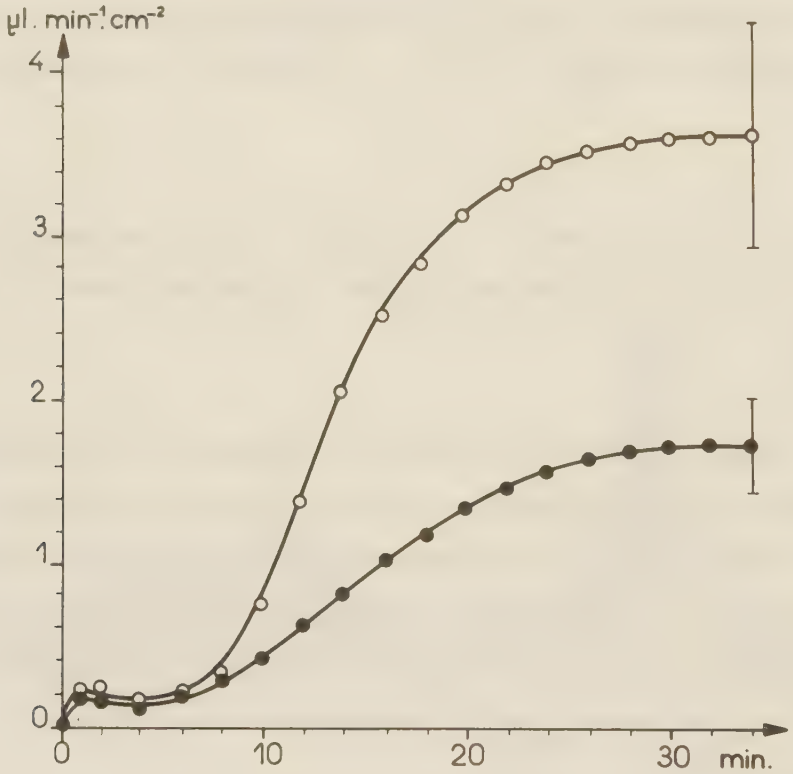


Figure 7

Réponse hydrosmotique à l'addition, au temps zéro, de 220 mOsm de mannitol ajoutées, soit à la solution qui baigne la face séreuse (O) (n = 7), soit aux solutions qui baignent les faces séreuse et muqueuse (●) (n = 10). En ordonnée : accroissement du flux net d'eau.

Les réponses aux milieux hypertoniques sont réversibles comme les réponses aux hormones neurohypophysaires et la préparation peut répondre ultérieurement à un autre stimulus tel que l'ocytocine (Figure 6).

IV.3 - ETUDE DES PARAMETRES DE LA REPONSE AU MANNITOL

La valeur moyenne du flux observée au maximum de la réponse à l'addition de 220 mOsm de mannitol du côté séreux est de $2,468\ \mu l.min.^{-1}\ cm^{-2} \pm 0,20$ (n = 40) ; le T 1/2 moyen (c'est-à-dire : le temps nécessaire pour que l'accroissement du flux net d'eau atteigne la moitié de sa valeur maximale) est de 16,5 minutes $\pm$ 0,90 (n = 40). C'est par ce paramètre que la réponse aux milieux hypertoniques diffère le plus de la réponse à l'ocytocine (T 1/2 moyen sur les mêmes préparations : 6,57 $\pm$ 0,25 min., n = 36). La période de latence, plus longue dans le cas de la réponse à l'addition du mannitol, n'est cependant pas la seule cause de cette différence, l'accroissement même du flux est plus lent si l'on en juge par le rapport $\frac{T\ 50\ °/_{o}}{T\ 75\ °/_{o} - T\ 25\ °/_{o}}$. Ce rapport est de 2,834 (n = 20) pour l'ocytocine, il est de 1,238 (n = 20) pour le mannitol. La pente est deux fois plus faible dans le cas de la réponse aux milieux hypertoniques.

IV.4 - NATURE DU SOLUTE

Comme l'avait déjà noté BENTLEY (7), l'importance de la réponse observée dépend de la nature du solute utilisé pour rendre les milieux hypertoniques. Si,au lieu de mannitol (auquel l'épithélium est très peu perméable),nous utilisons du NaCl (115 mM) (auquel les cellules épithéliales de la vessie sont également peu perméables), nous observons un accroissement moyen du flux net d'eau de $1,510 \pm 0,33\ \mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ contre 1,12 $\pm$ 0,21 en réponse à 220 mOsm de mannitol pour une série

expérimentale de 11 animaux. Les T 1/2 moyens sont de 16,8 ± 1,9 (NaCl) et 17.2 ± 2,8 (mannitol) minutes.

L'utilisation d'un solute qui traverse facilement les membranes cellulaires tel que l'urée (78) n'entraîne qu'une faible réponse hydrosmotique quand il est ajouté aux mêmes concentrations que le mannitol au milieu séreux. A concentration plus élevée (1 M) cependant, nous observons un important accroissement du flux net d'eau. Les faibles valeurs des T 1/2 des réponses à l'urée sont peut être liées au caractère de solute perméant de cette molécule.

La figure 8 représente les courbes moyennes des flux net d'eau en réponse à l'addition de mannitol, de NaCl et d'urée. Les réponses à différentes concentrations d'urée sont présentées dans la Figure 9 ; tous ces effets sont réversibles et les préparations restent stimulables. L'ensemble de ces résultats et les valeurs correspondantes observées en réponse à l'ocytocine sont reprises dans le Tableau I. Ce tableau montre que par rapport aux séries expérimentales décrites plus haut, l'accroissement maximum peut varier alors que les T 1/2 restent relativement stables.

Enfin, comme le montre la Figure 10, nous n'avons observé aucune corrélation entre l'intensité de la réponse et la vitesse à laquelle elle se développe.

IV.5 - L'HYPERTONICITE DU MILIEU MUQUEUX

Dans quelques expériences, nous avons comparé les accroissements de flux observés lorsque, soit le compartiment séreux, soit le compartiment muqueux, était rendu hypertonique. Dans cette dernière condition, le flux étant inversé, ce sont les variations de volume du compartiment séreux qui sont mesurées. Au repos, les deux faces sont

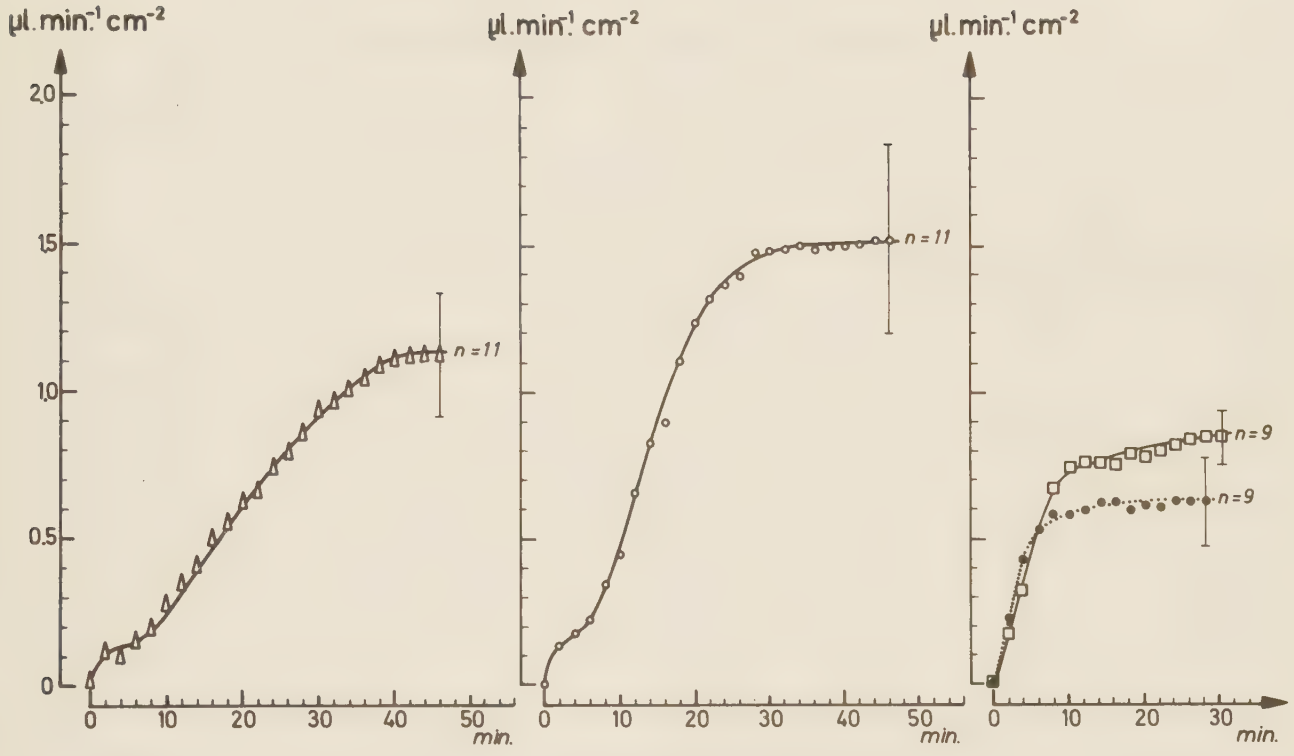


Figure 8

Moyennes des réponses hydrosmotiques au mannitol (220 mOsm) : Δ ; au NaCl (115 mM) : O , à l'urée (220 mOsm) : ● et (500 mOsm) : □ .

Les différents solutes sont ajoutés au temps zéro au seul compartiment séreux.

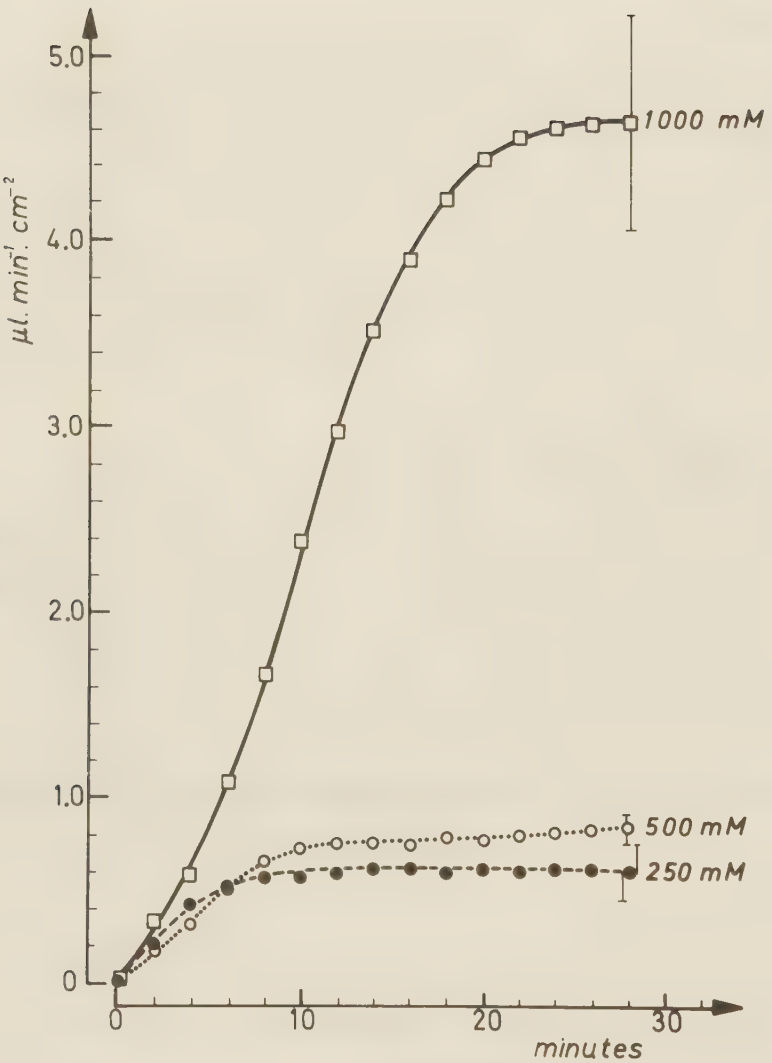


Figure 9

Moyenne des réponses hydrosmotiques à différentes concentrations d'urée ajoutée au temps zéro au milieu séreux (n = 9).

TABLEAU I

Moyennes des accroissements maximaux du flux net d'eau et des temps nécessaires pour atteindre la moitié de ces valeurs (T 1/2) en réponse à l'addition de différents solutes et de l'hormone neurohypophysaire

	Accroissement maximum du flux net d'eau *	T 1/2 **	N
Mannitol 220 mOsm	2,468 ± 0,20 ***	16,5 ± 0,90	40
NaCl 115 mM	1,41 ± 0,146	16,02 ± 0,95	34
Urée 1 000 mOsm	4,64 ± 0,58	10,09 ± 1,14	9
Urée 500 mOsm	0,84 ± 0,089	7,21 ± 1,13	9
Urée 220 mOsm	0,62 ± 0,15		9
Ocytocine 2.10^{-8} M	1,486 ± 0,105	6,57 ± 0,25	36

* en $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$

** en minutes

*** erreur standard.

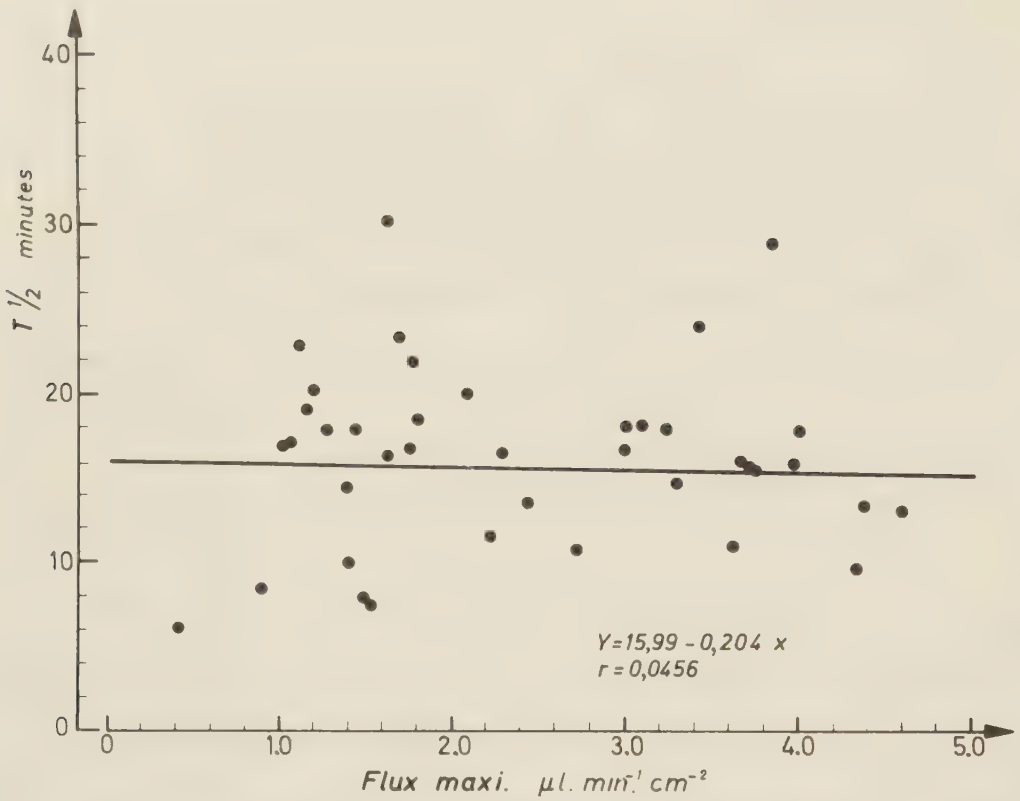


Figure 10

Relation entre l'accroissement maximal du flux net d'eau et le temps nécessaire pour atteindre la moitié de cet accroissement (T 1/2). Préparations stimulées par l'addition de 220 mOsm de mannitol au compartiment séreux.

baignées par une solution normale de Ringer. Au temps zéro, 220 mOsm de mannitol sont ajoutées, soit au compartiment muqueux, soit au compartiment séreux. Le tracé de la Figure 11 représente une de ces expériences. Nous remarquons que le flux net d'eau dans le sens séreux-muqueux est également accru par l'application du gradient de concentration osmotique. En moyenne cependant, l'accroissement est plus faible dans le sens séreux-muqueux que dans le sens normal muqueux-séreux :

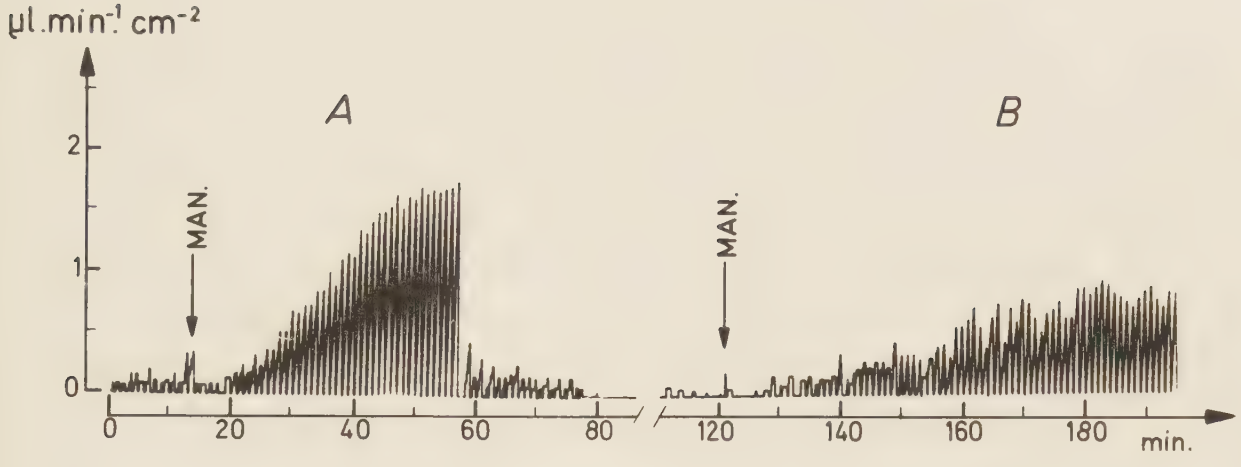


Figure 11

Comparaison des réponses hydrosmotiques d'une vessie à 220 mOsm de mannitol ajoutées, soit du côté séreux (A), soit du côté muqueux (B).
Au repos les deux faces de la vessie sont baignées par des solutions de Ringer.

1,05 µl. min^{-1}. cm^{-2} contre 1,46 µl. min^{-1}. cm^{-2} (n = 3). Ce résultat est en accord avec certaines observations antérieures de BENTLEY (6 , 8) sur Bufo Marinus.

IV.6 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'ADAPTATION DES ANIMAUX

Les similitudes des réponses hydrosmotiques aux milieux hypertoniques et à l'ocytocine nous ont amené à rechercher si certains facteurs qui influencent la réponse à l'hormone, modifiaient également la réponse au stimulus hypertonique.

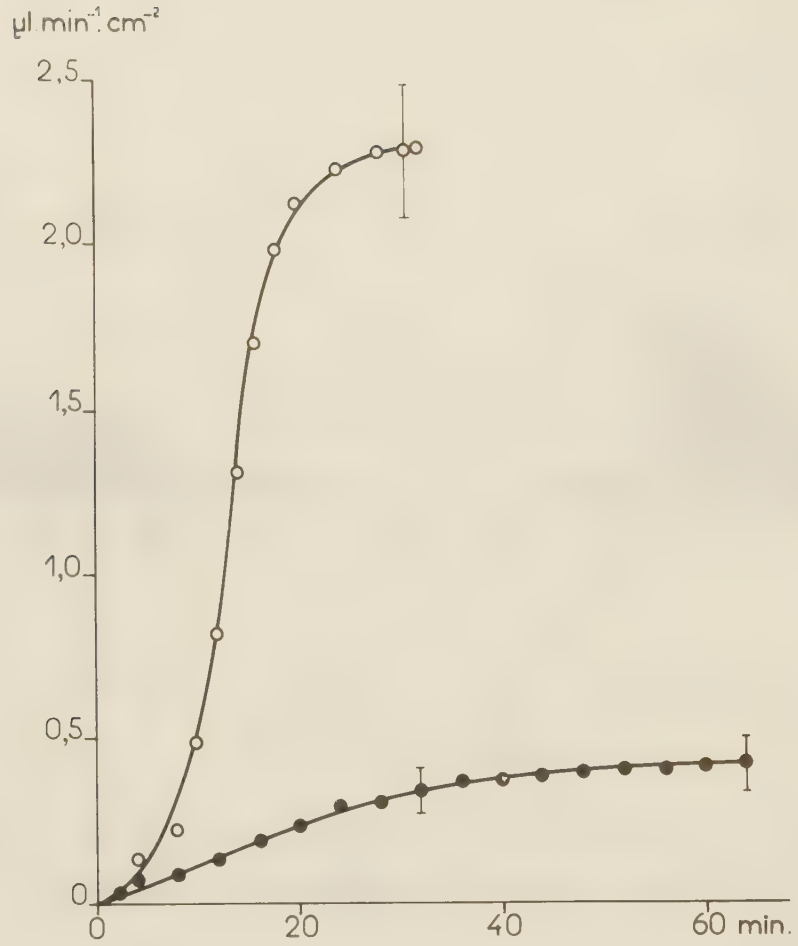


Figure 12

Influence de l'adaptation préalable des animaux à basse température sur la réponse hydrosmotique aux milieux hypertoniques. 220 mOsm de mannitol sont ajoutées au milieu séreux au temps zéro. Moyenne des accroissements du flux net d'eau à travers des vessies d'animaux adaptés à 22°C (O) n = 11 ou à 2°C (●) n = 26 . Les expériences sont effectuées à la température du laboratoire.

La température à laquelle sont adaptés les animaux conditionne la sensibilité de la préparation isolée (16 , 108). Si nous testons l'action de l'hypertonicité sur des vessies d'animaux maintenus pendant 8 jours à 2°C, nous observons une diminution très forte de l'intensité de la réponse (Figure 12). Les expériences sont effectuées à la température du laboratoire. Les valeurs respectives en réponse à 220 mOsm de mannitol sont $0,409 \pm 0,08$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ (n = 26) à 2°C et $2,24 \pm 0,23$ à 22°C (n = 11). Dans les mêmes séries expérimentales l'accroissement du flux net d'eau en réponse à $0,88.10^{-8}$ M d'ocytocine est de $0,565 \pm 0,153$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ (n = 16) pour des vessies d'animaux adaptés à 2°C, il est de $1,385 \pm 0,255$ (n = 11) pour les animaux adaptés à 22°C.

IV.7 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE D'INCUBATION DE LA PREPARATION

La réponse hydrosmotique aux hormones neurohypophysaires est dépendante de la température du milieu d'incubation de la préparation (14 , 107). Le Tableau II montre que la réponse à l'addition de 220 mOsm de mannitol l'est aussi. Il est relatif à des accroissements du flux net d'eau et à des T 1/2 mesurés à 20°C et 30°C sur les mêmes préparations. Si le flux maximum atteint est peu modifié, la cinétique est très fortement affectée par l'abaissement de la température. Le Q_{10} moyen pour les T 1/2 est de $2,38 \pm 0,38$ (n = 7). Cette valeur est proche de celle rapportée par BOURGUET pour les T 1/2 des réponses à l'ocytocine (14).

IV.8 - CONCLUSION

Nous avons observé plusieurs similitudes entre les réponses aux milieux hypertoniques et à l'ocytocine :

1°- même cinétique de l'accroissement du flux, au moins quant à l'allure générale de la courbe ;

TABLEAU II

Effet de la température du milieu d'incubation sur la réponse hydrosmotique aux milieux hypertoniques
(Mannitol : 220 mOsm du côté séreux)

	n	20°C	30°C	Q_{10}
Accroissement maximal du flux net d'eau ($\mu l. min^{-1}. cm^{-2}$)	7	2,29 ± 0,27	2,75 ± 0,32	1,23 ± 0,10
T 1/2 (min.)	7	13,0 ± 1,6	5,9 ± 0,2	2,38 ± 0,39

2°- même dépendance des conditions physiologiques d'adaptation ;

3°- même influence de la température du milieu d'incubation.

Elles suggèrent l'existence de points communs dans les mécanismes de réponse à ces deux stimuli. Dans le chapitre suivant nous avons recherché si les milieux hypertoniques interféraient avec les premières étapes de l'action hormonale et réciproquement.

CHAPITRE V

INTERACTIONS AVEC LE SYSTEME CYCLASIQUE

V.1 - INTRODUCTION : LE SCHEMA CLASSIQUE

C'est en 1964 que ORLOFF et HANDLER émirent l'hypothèse que le 3', 5'-adénosine monophosphate cyclique (AMP_c) pourrait être le médiateur de l'action des hormones neurohypophysaires sur la vessie des amphibiens (90 , 92). Le schéma de cette médiation, devenu classique maintenant, fait intervenir l'hormone au niveau d'une cyclase qui catalyse la production d'AMP_c à partir d'ATP. Cet AMP_c, par une suite de réactions, entraîne la perméabilisation à l'eau de la face apicale de la vessie. Par ailleurs, l'AMP_c est métabolisé en 5' AMP par une phosphodiestérase qui peut être inhibée par les méthylxantines et plus particulièrement la théophylline qui est très active sur ce type de structure.

Deux types d'inhibiteurs de l'activité cyclasique au niveau de la vessie des amphibiens ont été mis en évidence par ORLOFF et HANDLER : la prostaglandine E_1 (PGE_1) en 1965 (93) et les catécholamines en 1967 (57 , 58). Le site d'action de ces inhibiteurs serait la cyclase elle-même puisque leur action se manifeste sur la réponse à l'hormone et à la théophylline et non sur la réponse à l'AMP_c exogène. Nous avons recherché si ces inhibiteurs avaient une influence sur la réponse aux milieux hyper-

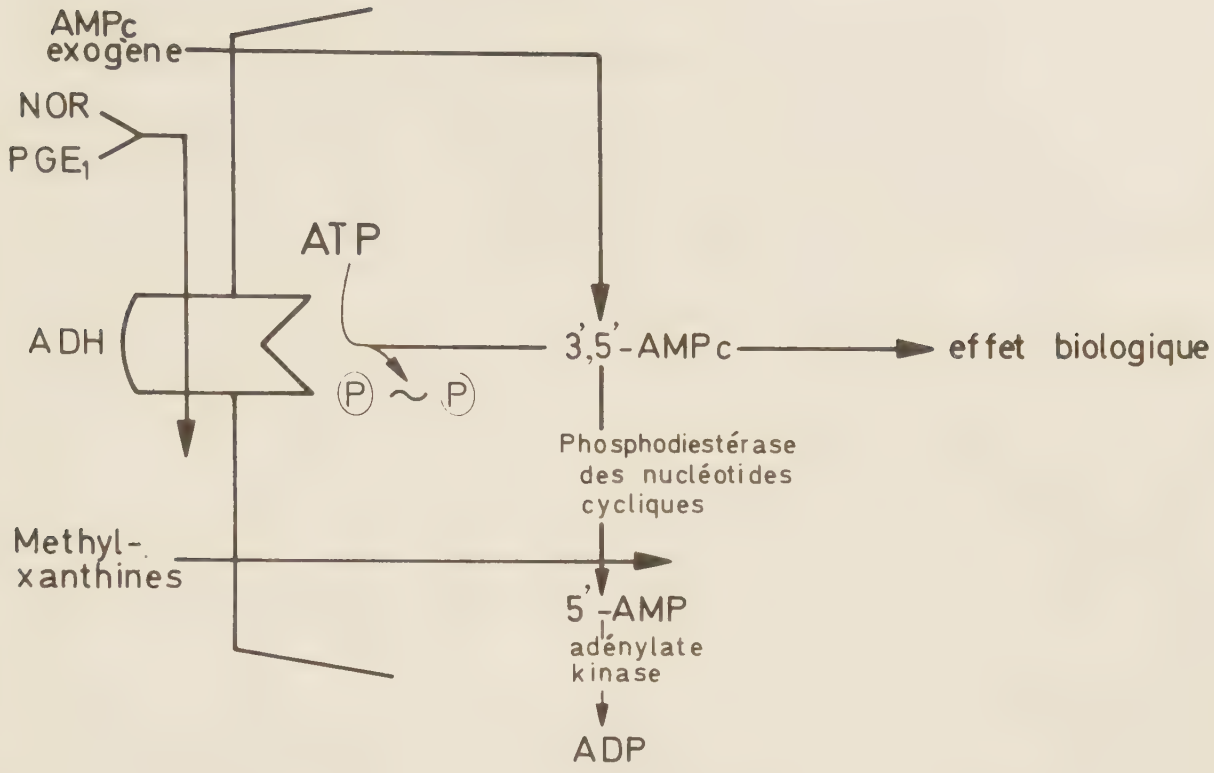


Figure 13

Schéma du mode d'action des hormones neurohypophysaires

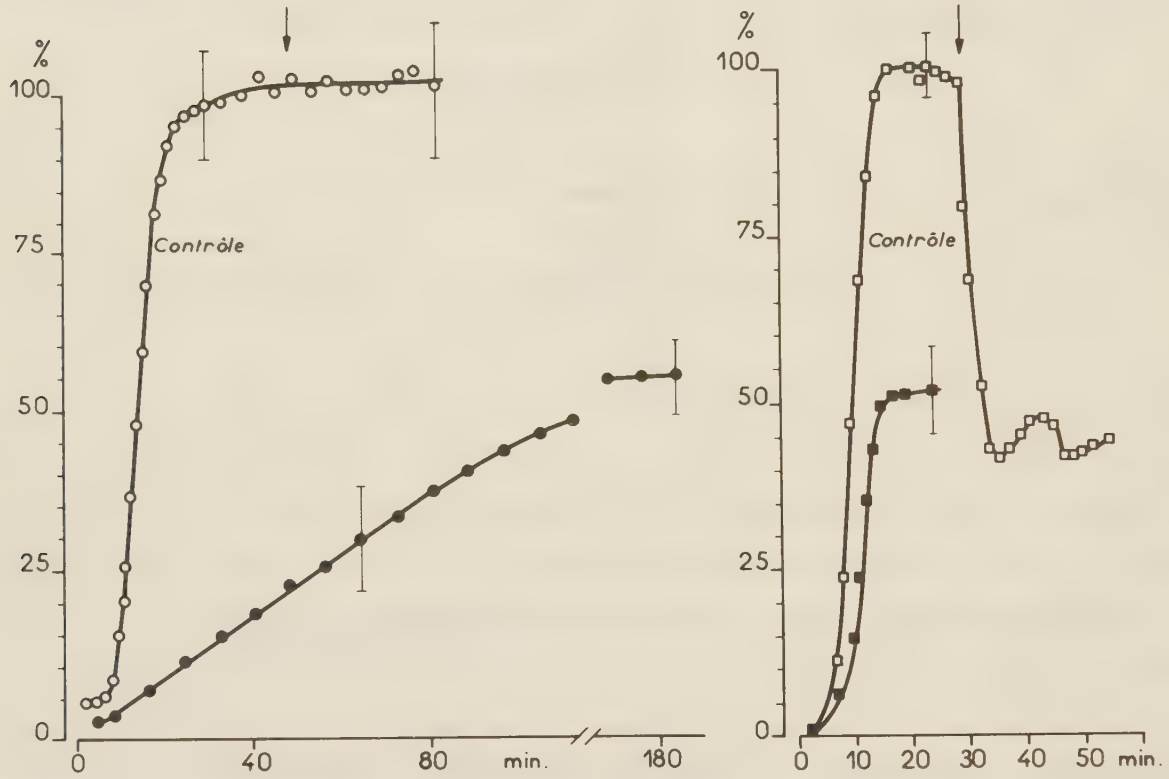
toniques afin de préciser si l'hypertonicité agit par l'intermédiaire ou sur ce système cyclasique. La Figure 13 représente le schéma du mode d'action des hormones neurohypophysaires sur la perméabilisation à l'eau tel qu'il est connu actuellement. Nous nous y référerons en fonction de nos observations.

V.2 - ACTION DES CATECHOLAMINES

V.2.1 - La noradrénaline

Deux conditions expérimentales ont été retenues. La première : la préparation est soumise à l'agoniste (milieu hypertonique ou ocytocine)

en présence de noradrénaline (10^{-5} M) ajoutée au milieu séreux 15 minutes avant l'addition de ce dernier. La deuxième : la noradrénaline est ajoutée lorsque la réponse au stimulus de perméabilisation a atteint sa valeur maximale. Les Figures 14 et 15 présentent les résultats observés dans ces deux conditions pour le mannitol et pour l'ocytocine. Il apparaît que les deux



Figures 14 et 15

Inhibition de la réponse hydrosmotique par la noradrénaline (10^{-5} M). Comparaison des inhibitions des réponses au mannitol (220 mOsm), Figure 14, et à l'ocytocine (10^{-8} M), Figure 15, soit lorsque l'inhibiteur est ajouté 15 minutes avant l'addition de l'agoniste (sigles pleins, n = 10 pour le mannitol, n = 5 pour l'ocytocine), soit lorsque l'inhibiteur est ajouté (flèches) au maximum de la réponse (sigles évidés, n = 10 pour le mannitol, n = 7 pour l'ocytocine).

types de réponses sont inhibés lorsque la noradrénaline est ajoutée préalablement au milieu d'incubation. Les pourcentages d'inhibition sont de 43, 7 °/₀ ± 4, 91 pour l'ocytocine 10^{-8} M (n = 5) et de 33, 8 °/₀ ± 9, 52 pour le mannitol (n = 9). Ces moyennes des pourcentages d'inhibition sont calculées à partir des valeurs individuelles. Toutefois, seule la réponse au mannitol est ralentie. Le T 1/2 de la réponse à l'hypertonicité est de 66, 4 ± 9, 4 minutes en présence de l'inhibiteur contre 12, 4 ± 0, 75 pour la réponse contrôle (n = 10).

Si la noradrénaline est ajoutée lorsque la réponse est développée, nous observons toujours une inhibition de la réponse à l'ocytocine mais la réponse à 220 mOsm de mannitol n'est plus inhibée.

Dans une autre série d'expériences nous avons remplacé le mannitol par 115 mM de NaCl. Le Tableau III donne les valeurs moyennes des deux types d'inhibition avec 10^{-5} et 10^{-6} M de noradrénaline. Il semble

TABLEAU III

Inhibition de la réponse à 115 mM de NaCl par la noradrénaline

Concentration de noradrénaline	10^{-5} M		10^{-6} M	
Temps de l'addition	15' avant NaCl	sur la réponse développée	15' avant NaCl	sur la réponse développée
°/₀ d'inhibition	83, 47 °/₀ ± 3, 61	41, 79 °/₀ ± 3, 31	43, 29 °/₀ ± 7, 53	0 °/₀
N	8	11	10	10

dans ce cas que la préparation est plus sensible à l'inhibiteur. La préincubation avec la noradrénaline (10^{-5} M) réduit à 16,5 °/₀ du contrôle la réponse à l'addition de NaCl. Nous observons en outre une certaine inhibition du flux d'eau lorsque l'inhibiteur est ajouté au maximum de la réponse, mais cette inhibition est faible et n'est pas comparable à celle que nous avons observée dans le cas de la préincubation. Lorsque, à concentration plus élevée la noradrénaline (10^{-4} M) est ajoutée au maximum de la réponse, la réduction du flux est significative : la différence des moyennes appareillées est de $- 0,75 \pm 0,28$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$, $n = 8$, $P < 0,05$. Cet effet est par ailleurs très lent : la différence observée ci-dessus est obtenue 80 minutes après l'addition de l'inhibiteur. Précisons que le flux net d'eau présente une décroissance spontanée lorsqu'il est obtenu par addition de NaCl.

Certains auteurs (BASTIDE et JARD , 3 ; RAJERISSON et coll., 104) ont montré que la noradrénaline avait sur une structure, il est vrai différente, la peau de grenouille, deux effets distincts : à concentration faible (10^{-8} M), stimulation du transport de sodium ; à concentration élevée (10^{-5} M), augmentation des flux unidirectionnels de chlore et du flux sortant de sodium. Nous n'avons pas observé d'action biphasique de la noradrénaline sur la réponse hydrosmotique. A faible concentration (10^{-9} M) aucun effet de la noradrénaline n'est observé.

V.2.2 - Autres catécholamines

L'adrénaline (10^{-5} M) inhibe de la même façon les réponses aux milieux hypertoniques, son action est cependant plus faible (Tableaux IV et V). L'isoproterenol (10^{-5} M), un analogue qui agit presque exclusivement sur les récepteurs β , n'affecte pas la réponse hydrosmotique quelque soit le type de stimulation.

TABLEAU IV

Inhibition de la réponse hydrosmotique par l'adrénaline

	A Flux net H_2O * avant et après expérience sous adrénaline	B Flux net H_2O sous adrénaline *** (10^{-5} M)	B en °/₀ de A A = moyenne avant + après	N
Ocytocine $2,2.10^{-8}$ M	Av. : 2,193 ± 0,252** Ap. : 3,379 ± 197	2,054 ± 0,256	73,7 °/₀	7
Mannitol 220 mOsm	Av. : 1,752 ± 0,378 Ap. : 1,812 ± 0,279	1,400 ± 0,390	78,5 °/₀	10
NaCl 115 mM	Av. : 1,657 ± 0,391 Ap. : 2,157 ± 0,432	1,325 ± 0,422	69,4 °/₀	7

* Flux en $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$

** Erreur standard

*** Adrénaline ajoutée 15 minutes avant l'ocytocine, le mannitol ou le NaCl.

TABLEAU V

Inhibition par l'adrénaline de la réponse hydrosmotique développée

	Flux maximum* avant addition d'adrénaline (10^{-5} M)	Flux stabilisé en présence d'adrénaline	Flux maximum après rinçage de l'adrénaline
Ocytocine $2,2.10^{-8}$ M	2,89 ± 0,225** (5)	1,23 ± 0,296 (5)	1,942 ± 0,210 (3)
Mannitol 220 mOsm	1,565 ± 0,204 (10)	1,262 ± 0,122 (10)	1,500 ± 0,403 (8)
NaCl 115 mM	2,254 ± 0,434 (7)	2,171 ± 0,444 (7)	2,200 ± 0,496 (5)

* Flux en $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$

** Erreur standard

Entre parenthèses : nombre d'expériences.

V.2.3 - Récepteurs adrénergiques impliqués

Le fait que l'isoproterenol ne modifie pas la réponse à l'ocytocine et aux milieux hypertoniques laisse supposer que ce sont les récepteurs α qui sont en cause dans ce type d'inhibition. Nous avons ajouté au milieu d'incubation en même temps que la noradrénaline des agents β bloquants : DCI 10^{-4} M ; propanolol 10^{-5} M. L'inhibition n'est pas levée par ces agents. Par contre, la phentolamine, un α bloquant restaure l'action normale des milieux hypertoniques. La Figure 16

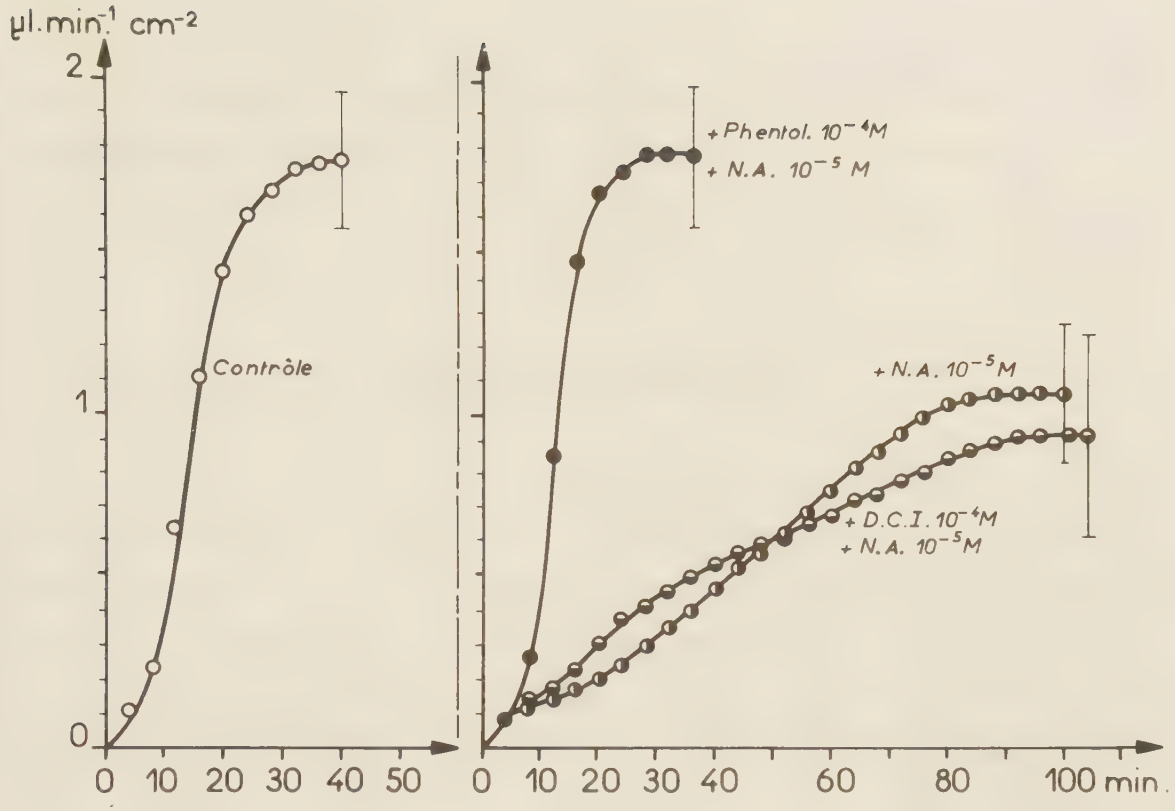


Figure 16

Influence de la phentolamine (Phentol, n = 9) et du dichloroisoproterenol (D.C.I., n = 9) sur l'inhibition de la réponse hydrosmotique au mannitol (220 mOsm ajoutées au compartiment séreux au temps zéro) par la noradrénaline (N.A.).

présente les courbes moyennes de réponse à 220 mOsm de mannitol en présence et en l'absence de noradrénaline et des agents bloquants D.C.I. ou phentolamine. L'action de la phentolamine sur l'inhibition des catécholamines, dans nos conditions expérimentales, est réversible quant à l'intensité de la réponse mais irréversible quant au ralentissement de la cinétique de cette réponse (Figure 17). Autrement dit, la noradrénaline après une incubation transitoire en présence de phentolamine entraîne toujours une inhibition de l'accroissement du flux net d'eau en réponse à l'addition de mannitol mais ne modifie plus la vitesse à laquelle le flux s'installe . La raison de cette dissociation est

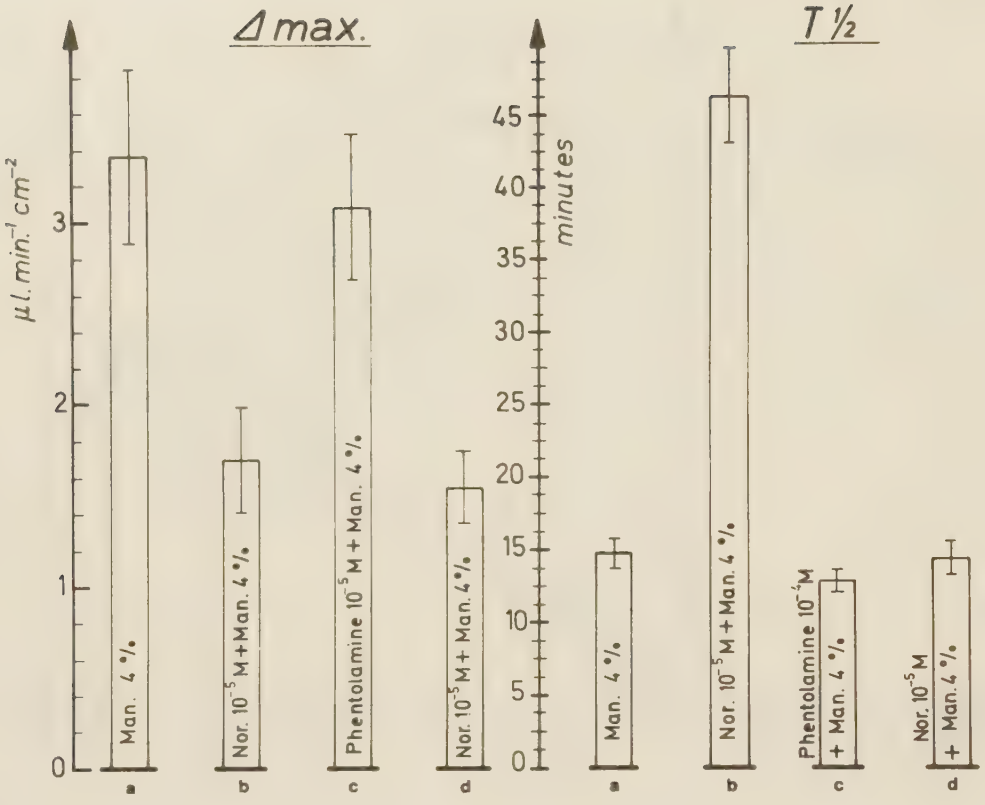


Figure 17

Réversibilité de l'action de la phentolamine.

- Partie gauche : moyenne des accroissements du flux net d'eau (Δ max.) en réponse à l'addition de mannitol (220 mOsm : Man 4 °/₀ , n = 5) utilisé successivement : seul (a), en présence de noradrénaline (b), en présence de phentolamine (c) et à nouveau en présence de noradrénaline (d). L'action inhibitrice de la noradrénaline persiste (comparer b et d).

- Partie droite : moyenne des T 1/2 des accroissements du flux net d'eau (T 1/2) mesurés dans les différentes conditions exposées ci-dessus. En d , le ralentissement de la réponse n'est plus observé sous l'action de la noradrénaline (comparer à b).
  Noter que la phentolamine n'a pas d'effet par elle-même (c).
  Entre la fin d'une stimulation et le début de la suivante il s'écoule environ 30 minutes.

inconnue. On peut penser toutefois, qu'après traitement par la phentolamine, il persiste une inhibition partielle de l'action des catécholamines, suffisante pour supprimer un de ses effets (le ralentissement de la réponse aux milieux hypertoniques) et non l'autre (diminution de l'intensité de la réponse).

V.2.4 - Influence de la concentration d'AMPc

Si l'influence de la noradrénaline est consécutive à un abaissement de la concentration d'AMP_c dans l'assise épithéliale, il devrait être possible d'annuler son effet par de l'AMP_c exogène. Le Tableau VI montre qu'en présence d'une concentration liminaire d'AMP_c (10^{-3} M) la réponse aux milieux hypertoniques n'est plus modifiée par la noradrénaline (10^{-5} M). La réponse propre à l'AMP_c est pratiquement nulle dans toutes ces expériences.

TABLEAU VI

Effet de concentrations liminaires d'AMP_c sur la cinétique de réponse au mannitol en présence de noradrénaline

	Δ max * propre au mannitol	T 1/2 **	N
Mannitol seul (témoin) (220 mOsm)	1,56 ± 0,38	15,9 ± 1,07	7
Mannitol/noradrénaline (10^{-5} M)	0,82 ± 0,16	22,00 ± 2,04	7
Mannitol/AMP_c (10^{-3} M) + noradrénaline (10^{-5} M)	2,03 ± 0,26	11 2 ± 2,1	8

* Accroissement du flux net d'eau en $\mu l . min^{-1} . cm^{-2}$ ± erreur standard

** T 1/2 en minutes ± erreur standard.

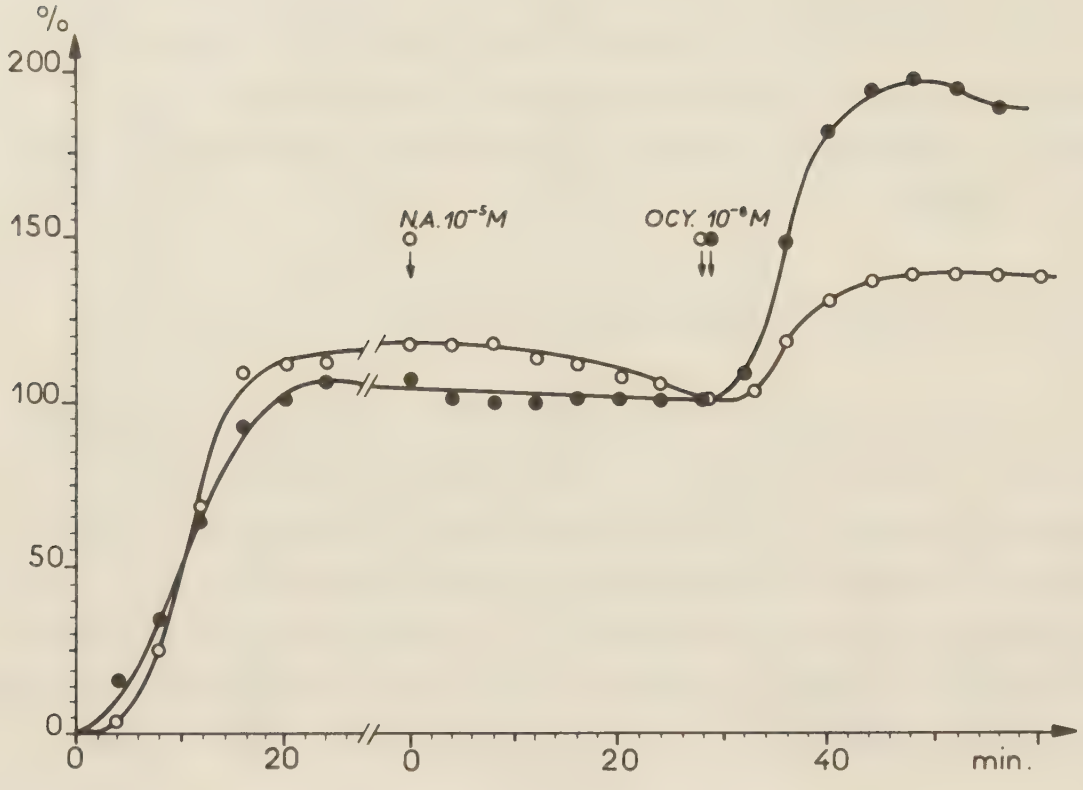


Figure 18

Inhibition par la noradrénaline (N. A.) d'une réponse hydrosmotique à l'ocytocine consécutive à la réponse aux milieux hypertoniques.

Les fragments traités et témoins sont stimulés par addition de mannitol (220 mOsm) au temps t = 0 et d'ocytocine (10^{-8} M) en fin d'expérience. Cette dernière réponse est précédée de l'addition de noradrénaline (10^{-5} M) au fragment traité (cercles évidés). L'accroissement du flux net d'eau est exprimé en pour cent de la valeur atteinte par le fragment contrôle (cercles pleins) au moment de l'addition d'ocytocine (moyenne de 6 expériences).

Notons toutefois, que le ralentissement de la réponse sous l'action de la noradrénaline est beaucoup plus faible dans cette série expérimentale que dans la série précédente (V.2.1).

Nous avons également contrôlé que la perte d'inhibition sur la réponse développée n'était pas causée par une insensibilisation du système cyclasique à la noradrénaline due à la présence prolongée d'un milieu hypertonique du côté séreux. La Figure 18 montre que la réponse à l'hormone qui se surajoute à la réponse au mannitol est toujours inhibée par la noradrénaline (10^{-5} M).

V.2.5 - Importance du gradient de pression osmotique

Bien qu'il semble peu probable que l'inhibition par les catécholamines puisse être dépendante de la différence de pression osmotique entre les milieux séreux et muqueux, nous avons vérifié que leur effet persistait lorsque les préparations sont incubées en présence de milieux hypertoniques des deux côtés et que le gradient osmotique est maintenu constant. Dans ces conditons, l'accroissement moyen du flux net d'eau passe de $1,34 \pm 0,21$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ sur le contrôle à $0,23 \pm 0,04$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ après noradrénaline 10^{-4} M. La moyenne des différences entre les valeurs appareillées est de $1,11 \pm 0,18$ $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$, $n = 8$, $P < 0,01$.

V.3 - ACTION DES PROSTAGLANDINES

On sait que la PGE_1 se comporte vis-à-vis de l'adénylcyclase de la vessie urinaire des amphibiens comme un inhibiteur (79 , 80 , 84 , 96). Nous avons recherché si, comme la noradrénaline, elle interférait avec la réponse aux milieux hypertoniques. La Figure 19 représente les enregistrements de deux expériences types.

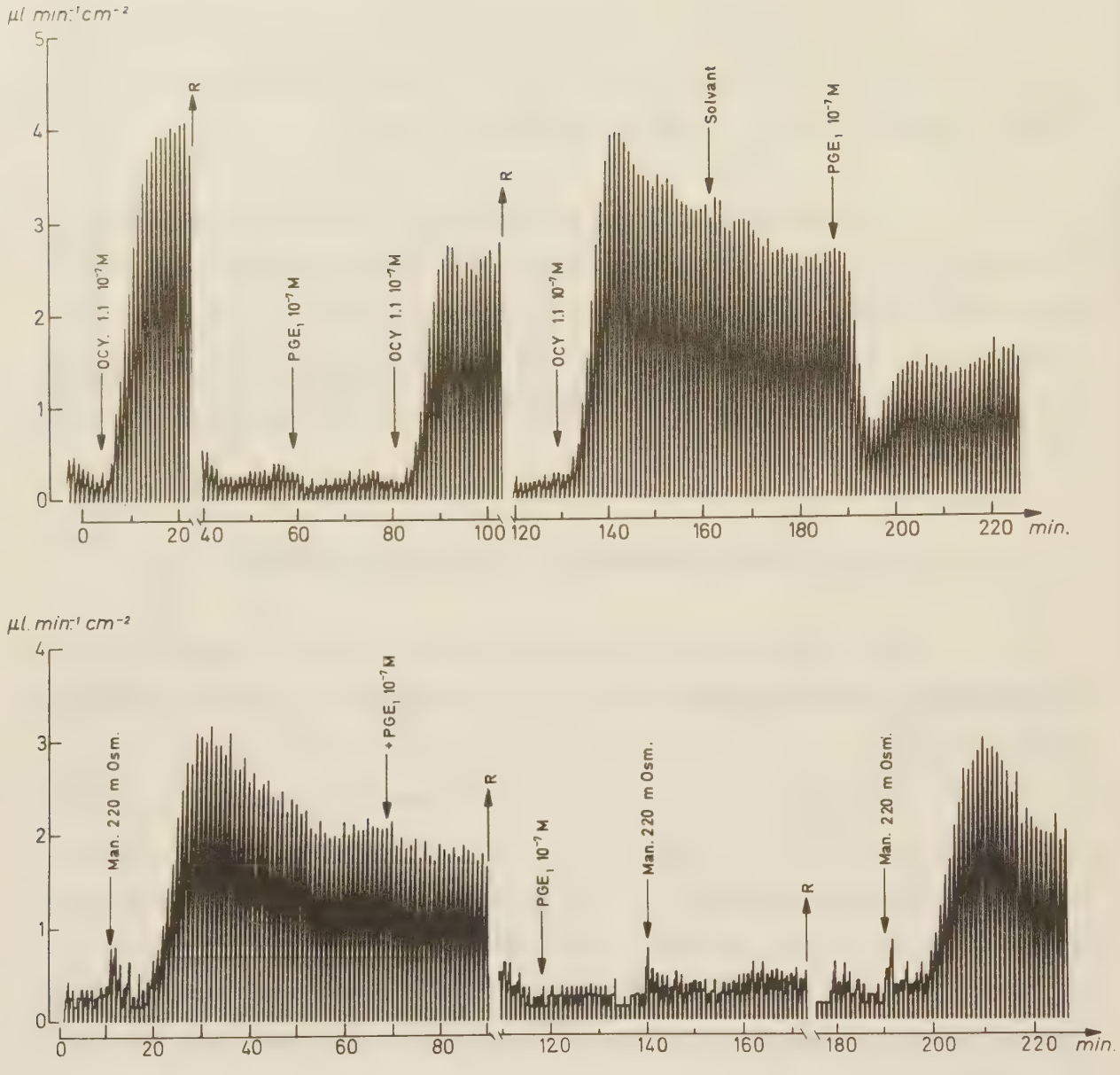


Figure 19

Action inhibitrice de la prostaglandine E_1(PGE_1) sur la réponse à l'ocytocine (tracé du haut) et au mannitol (tracé du bas). On notera que, contrairement à ce que nous observons dans le cas de l'ocytocine, la PGE_1 est sans effet sur la réponse développée sous l'action du mannitol et que la réponse au mannitol est complètement inhibée après un prétraitement.

D'une manière générale, nous observons les mêmes résultats qu'avec les catécholamines : suppression (Figure 19) ou réduction et ralentissement de la réponse lorsque la préparation est préincubée avec la PGE_1 (10^{-7} M) ; peu ou pas d'inhibition sur l'action développée. Le même type d'inhibition est observé que le milieu soit rendu hypertonique par addition de mannitol (220 mOsm) ou de NaCl (115 mM). Toutefois, l'inhibition de la réponse hydrosmotique au NaCl par la PGE_1 n'a pas été observée par EGGENA (46). Ces observations ayant été réalisées sur la vessie de Bufo marinus, il est possible qu'il s'agisse d'une différence d'espèce.

V.4 - AUTRES TYPES D'INHIBITEURS

BENTLEY (10) et HYNIE (64) ont montré que le Mn^{++} inhibe l'accroissement de la perméabilité à l'eau de la vessie stimulée par l'ocytocine, probablement en agissant au niveau de la cyclase. Le Tableau VII montre que l'addition de Cl_2Mn au milieu séreux entraîne également une inhibition de la réponse aux milieux hypertoniques ; il en est de même avec le Cl_2Zn. A la différence de la noradrénaline et des prostaglandines, ces deux cations agissent également sur la réponse développée (Tableau VIII). L'inhibition par le Zn^{++}, ajouté lorsque la réponse est développée, s'explique puisque, d'après BENTLEY (10), ce cation agirait beaucoup plus près de l'effecteur (il inhibe également la réponse à l'AMP_c). L'origine de l'inhibition par le manganèse de la réponse développée reste obscure si, comme le pensent BENTLEY et HYNIE, ce cation agit au niveau de la cyclase.

TABLEAU VII

Inhibition par le Zn^{++} et le Mn^{++} de la réponse hydrosmotique au mannitol

	N	A Mannitol 220 mOsm contrôle	B Mannitol en présence de l'inhibiteur ***	°/₀ d'inhibition	A - B ***	P
Zn^{++} 10^{-3} M	9	1,87 * ± 0,22	1,41 ± 0,33	22,44 ± 4,68	0,47 ± 0,13	< 0,01
Mn^{++} 10^{-3} M	9	3,03 ± 0,56	1,78 ± 0,38	40,58 ± 6,65	1,26 ± 0,27	< 0,005

* Flux en $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ et erreur standard

** Inhibiteur ajouté 15 minutes avant le mannitol

*** Moyenne des différences entre valeurs appareillées.

TABLEAU VIII

Inhibition par le Zn^{++} et le Mn^{++} de la réponse hydrosmotique développée

	N	A Mannitol 220 mOsm contrôle	B Mannitol 220 mOsm + agent inhibiteur	°/₀ d'inhibition	A - B **	P
Zn^{++} 10^{-3} M	10	1,77* ± 0,21	1,00* ± 0,09	39,88 ± 5,36	0,77 ± 0,16	< 0,001
Mn^{++} 10^{-3} M	6	2,35 ± 0,26	1,36 ± 0,19	41,62 ± 6,02	0,98 ± 0,19	< 0,01

* Flux en $\mu l.min^{-1}.cm^{-2}$ et erreur standard

** Moyenne des différences entre valeurs appareillées.

V.5 - INTERACTION AVEC LES AGENTS ACTIVATEURS DU SYSTEME CYCLASE - PHOSPHODIESTERASE

Il est intéressant de remarquer que si les inhibiteurs de la cyclase modifient la réponse hydrosmotique aux milieux hypertoniques, l'activation de la cyclase potentialise cette réponse. Trois agents, qui augmentent la concentration d'AMP_c dans le tissu, ont été utilisés : l'ocytocine, hormone qui stimule la production d'AMP_c, la théophylline qui inhibe sa destruction, l'AMP_c exogène. Pour obtenir une potentialisation nette, nous nous sommes placés dans des conditions où les milieux hypertoniques sont très peu actifs par eux-mêmes. Nous avons utilisé des vessies d'animaux adaptés à 2°C (Figure 12) et nous avons stimulé ces préparations avec des concentrations liminaires des agents indiqués plus haut. La Figure 20 rend compte de l'ensemble des résultats. Les symboles fermés représentent les réponses contrôles au mannitol (220 mOsm), les symboles ouverts, l'effet du mannitol sur des doses liminaires soit d'ocytocine, de théophylline ou d'AMP_c exogène. Dans tous les cas, le mannitol est ajouté au temps zéro (flèche verticale). Le flux observé dans les minutes qui précèdent, résulte de la réponse aux concentrations liminaires de chacun des différents agents. Le fait de doubler la différence de pression osmotique accroît à lui seul la valeur de ce flux d'un facteur deux. Il s'y ajoute ultérieurement l'augmentation du flux due à l'effet des milieux hypertoniques. Le fait que cette augmentation soit plus importante que celle observée sur le témoin implique une interaction positive entre les deux types de stimuli.

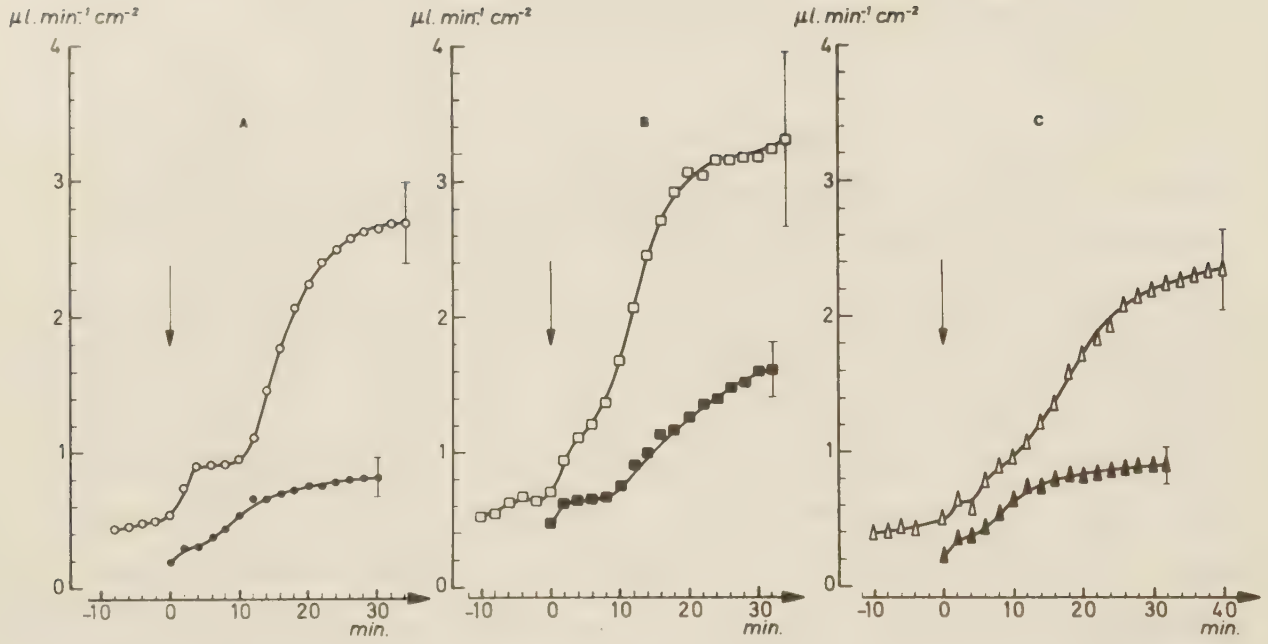


Figure 20

Influence de concentrations liminaires d'ocytocine ($2,2.10^{-9}$ M) A, de théophylline (10^{-3} M) B, et d'AMP_c ($2,5.10^{-3}$ M) C, sur la réponse hydrosmotique au mannitol 220 mOsm. Les fragments de vessie contrôles (sigles pleins). Les fragments expérimentaux (sigles ouverts) sont prétraités 20 minutes avant l'addition du mannitol au temps t = 0. L'expérience est réalisée sur des vessies d'animaux adaptés à 2°C (n = 9).

V.6 - INFLUENCE DES MILIEUX HYPERTONIQUES SUR LA REVERSIBILITE DE L'EFFET HYDROSMOTIQUE

V.6.1 - Introduction

Nous avons mis en évidence une interférence des milieux hypertoniques avec des agents activateurs ou inhibiteurs du système cyclasique. Certains résultats rendent peu probable une interaction des milieux hypertoniques avec les premières étapes de l'action de l'hormone antidiurétique. Ainsi :

1 - la cinétique de réponse aux milieux hypertoniques est fortement ralentie par la noradrénaline, ce qui n'est pas le cas pour l'ocytocine,

2 - la noradrénaline n'inhibe pas ou peu la réponse lorsqu'elle est développée,

3 - enfin, une concentration liminaire d'AMP_c exogène abolit l'action de la noradrénaline.

Il apparaît donc qu'une activité cyclasique de base ou plus exactement, une certaine concentration tissulaire d'AMP_c est nécessaire au développement de la réponse aux milieux hypertoniques alors que paradoxalement elle n'est pas indispensable au maintien de l'effet biologique lorsqu'il est développé.

La contradiction entre ces deux types d'observations pourrait toutefois n'être qu'apparente et l'assymétrie observée pourrait se comprendre si l'on admet que, contrairement à l'action de l'ADH qui s'exerce en accélérant la production d'un agent intermédiaire actif, l'action des milieux hypertoniques s'exercerait, elle, en ralentissant sa destruction : les deux stimuli aboutissant, l'un et l'autre, mais par des mécanismes différents, à déplacer l'équilibre de l'ensemble du système vers l'état

actif. Si l'intermédiaire impliqué existe en grande quantité dans le tissu (lorsque l'action des milieux hypertoniques est développée) l'addition de noradrénaline inhibe sa production sans abaisser notablement sa concentration. Par contre, lorsque la production de cet intermédiaire a été réduite (par exemple, quand la noradrénaline est ajoutée avant le mannitol) le blocage de sa destruction ne suffit plus à amener cet intermédiaire à une concentration efficace.

TABLEAU IX

Influence de l'hypertonicité sur la vitesse de réversibilité de la réponse hydrosmotique

Agent	T 1/2 de la réversibilité (min) *		N	P **
	Contrôle	Expérimental		
Ocytocine $2,2.10^{-8}$ M	4,47 ± 0,26	9,06 ± 1,07	15	< 0,001
Théophylline 5.10^{-3} M	5,44 ± 0,40	11,06 ± 0,53	15	< 0,001
AMP_c 5.10^{-3} M	4,70 ± 0,37	7,36 ± 0,43	10	< 0,001

* Moyenne ± erreur standard

** Calculés à partir des différences entre valeurs appareillées.

Une observation renforce cette hypothèse : le ralentissement de la réversibilité des actions de l'hormone, de la théophylline et de l'AMP_c exogène en présence de milieux hypertoniques (99).

V.6.2 - Résultats

Les vessies sont montées sur des appareils à deux voies de mesure. La première voie sert de contrôle ; ce fragment de vessie est incubé avec une solution de Ringer au contact de sa face séreuse, avec une solution de Ringer/20 au contact de sa face muqueuse ; sur l'autre voie, aux mêmes solutions, sont ajoutées 110 mOsm de mannitol de chaque côté de la préparation. Cette addition d'une faible quantité de mannitol, sans modification de la différence de pression osmotique, ne provoque pas de flux par elle-même. Au temps zéro, les deux fragments sont stimulés soit par l'ocytocine $2,2.10^{-8}$ M, par la théophylline 5.10^{-3} M ou par l'AMP_c 5.10^{-3} M, et, lorsque l'accroissement du flux d'eau est maximal, les préparations sont rincées par les solutions adéquates. Les T 1/2 de rinçage (c'est-à-dire le temps nécessaire pour que l'accroissement du flux soit ramené à la moitié de sa valeur maximale) sont mesurés. Les valeurs obtenues sont rassemblées dans le Tableau IX. Elles font apparaître que les rinçages en milieu hypertonique sont plus lents (111) .

V.7 - CONCLUSION

Le fait que la réponse aux milieux hypertoniques puisse être modifiée par des substances qui agissent au niveau de la cyclase, soit en l'activant, soit en l'inhibant, est un argument décisif en faveur d'une action spécifique de l'hypertonicité et suggère que des étapes biochimiques liées au système adénylcyclase-AMP_c sont impliquées dans cet accroissement de la perméabilité à l'eau. Comme nous l'avons vu cependant, l'inhibition par la noradrénaline et les prostaglandines présente certains caractères spécifiques : ralentissement de la réponse d'une part, absence d'inhibition si cette réponse est développée d'autre part. Ces observations peuvent être interprétées en plaçant le point d'insertion de l'action des

milieux hypertoniques dans ce système sur un équilibre dynamique entre deux processus d'activation et d'inactivation d'une des étapes conduisant à l'effet final. Cette étape serait postérieure à la production d'AMP_c. L'AMP_c contrôlerait le processus d'activation, l'hypertonicité, le processus d'inactivation. Cette hypothèse est confirmée par l'observation du ralentissement de la réversibilité de la réponse hydrosmotique lorsque la préparation est dans un milieu hypertonique.

Après avoir étudié le mécanisme d'action des milieux hypertoniques, nous avons recherché l'influence de la condition inverse sur la perméabilité à l'eau de la vessie, c'est-à-dire l'influence de l'hypotonicité.

CHAPITRE VI

EFFET DE L'HYPOTONICITE

VI.1 - INTRODUCTION

Si l'incubation dans les milieux hypertoniques augmente la perméabilité à l'eau de la vessie, on peut s'attendre à ce que l'incubation dans des milieux hypotoniques exerce une action en sens inverse : réduction de la perméabilité à l'eau. Un tel effet était difficile à mettre en évidence au niveau du flux de base mais une autre condition expérimentale nous a semblé plus favorable, d'autant qu'elle correspond à une situation plus physiologique. Nous avons recherché l'effet de l'hypotonicité lorsque la vessie est stimulée par l'hormone antidiurétique.

Nous savons en effet depuis les travaux de PAK POY et BENTLEY (1960) (97) et de CARASSO et al. (1962) (22) que la vessie stimulée par les hormones neurohypophysaires présente, lorsqu'elle est fixée au maximum de la réponse, des espaces intercellulaires fortement dilatés. Les cellules épithéliales ont leur cytoplasme gonflé et rempli de vacuoles. Enfin, le flux qui traverse la préparation est très hypotonique par rapport à la tonicité cellulaire. On peut penser que dans de telles conditions, la préparation ou tout au moins les cellules épithéliales

sont hypotoniques et nous avons mis à profit cette condition expérimentale. Des résultats préliminaires ont été décrits précédemment (17).

VI. 2 - DESCRIPTION D'UNE EXPERIENCE TYPE

Dans ces expériences, dont la Figure 21 représente un enregistrement type, la préparation est incubée des deux côtés avec une solution de Ringer ; il n'y a pas de différence de pression osmotique entre les deux faces et donc pas de flux net d'eau. La vessie est alors stimulée

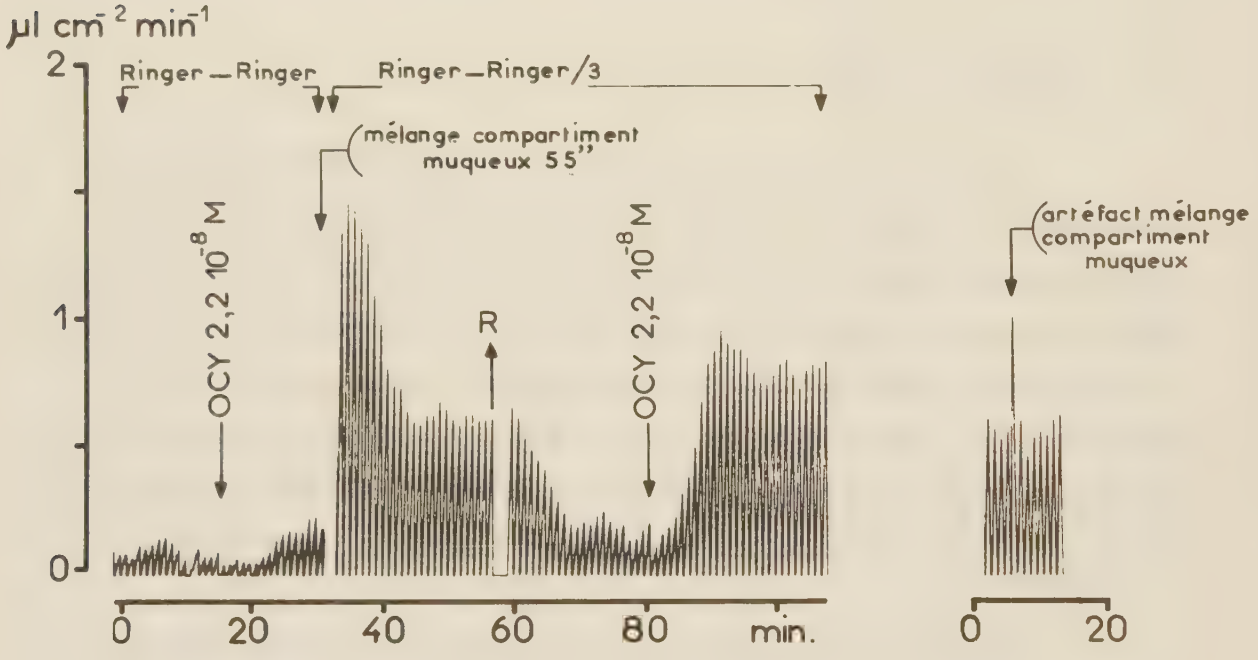


Figure 21

Evolution du flux net d'eau après l'établissement d'une différence de pression osmotique à travers une vessie prétraitée par l'ocytocine. A droite, un exemple d'artefact introduit par le mélange du compartiment muqueux. Commentaires dans le texte.

par l'ocytocine pendant 15 à 20 minutes, temps nécessaire à température ambiante, au plein développement de la réponse hormonale. Ensuite, toujours en présence d'hormone, un gradient osmotique est rapidement établi en diluant le compartiment muqueux. Aussitôt le flux s'installe, il est très élevé puis il diminue progressivement pour atteindre une nouvelle valeur d'équilibre. Nous emploierons parfois le terme "d'overshoot" pour désigner ce phénomène. Après rinçage de l'hormone, le flux net d'eau revient à son niveau de base et une nouvelle stimulation par l'ocytocine entraîne un flux net d'eau dont la valeur d'équilibre est du même ordre de grandeur que celle observée après l'établissement du gradient.

VI.3 - CRITIQUE DU PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Nous avons contrôlé que les observations décrites ci-dessus ne sont pas dues à un artefact expérimental, notamment à l'existence d'une pression hydrostatique requise par la technique utilisée.

VI.3.1 - Rôle de la pression hydrostatique

Dans le but de vérifier si la pression hydrostatique peut jouer un rôle dans le phénomène observé, nous avons fait varier cette pression et nous avons remarqué que si l'application d'une pression plus faible (5 cm d'eau au lieu de 15 cm) diminue l'ampleur du pic, elle ne le supprime pas (Figure 22). La signification de cette réduction d'amplitude est douteuse. Elle est probablement due à un léger déplacement de la préparation au moment de l'établissement du gradient osmotique. Ce mouvement entraîne une diminution de volume du compartiment muqueux qui ne retrouve ses dimensions normales qu'après quelques minutes. Le fait que le T 1/2 du processus soit allongé dans ces conditions, plaide en faveur de cette interprétation.

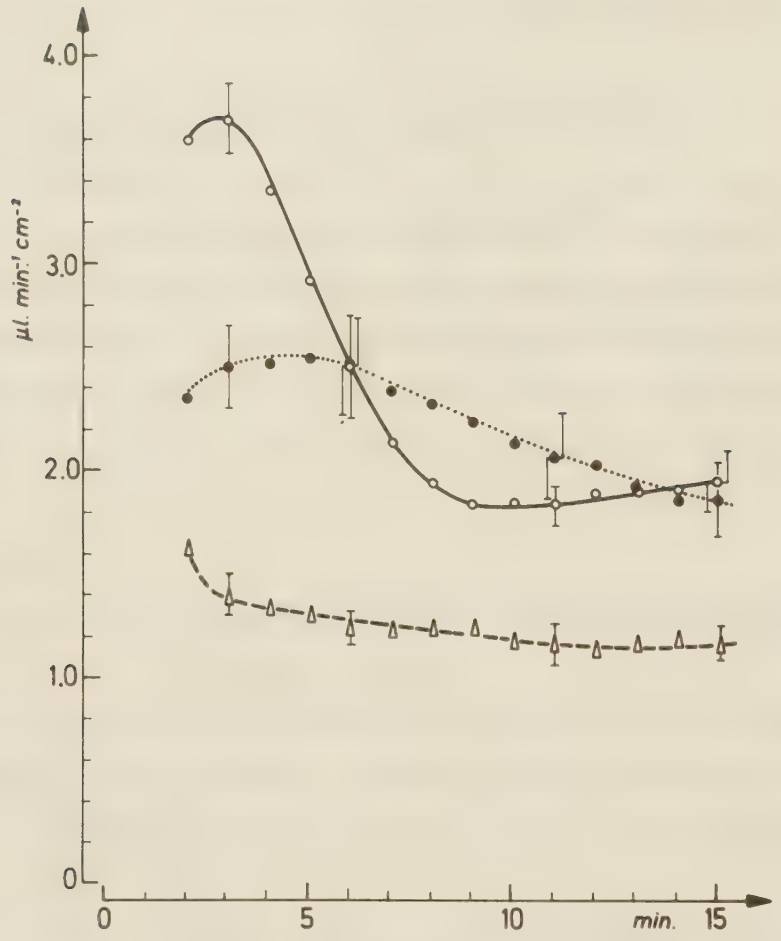


Figure 22

Influence de la fixation par la glutaraldéhyde (triangles) (n = 4) et de la pression hydrostatique : 5 cm d'H_2O (cercles pleins) (n = 7) sur l'évolution du flux net d'eau déclenché par l'établissement rapide d'une différence de pression osmotique à travers la préparation. Les cercles ouverts représentent la moyenne des expériences témoins (pression hydrostatique : 15 cm d'H_2O , n = 7). Commentaires dans le texte.

Il est possible, par ailleurs, de mettre en évidence le même type de rétroaction du flux net d'eau sur lui-même en utilisant une technique de mesure gravimétrique où les variations de pression hydrostatique restent toujours très faibles. Cette observation réalisée initialement sur la vessie de Bufo marinus (BOURGUET et coll., 18) a été reproduite sur la vessie de grenouille. Dans ces expériences la vessie est inversée et fixée sur un tube de polyéthylène ; la surface utilisée est de 2 cm^2 environ et le volume de la solution de Ringer qui baigne la face séreuse (à l'intérieur du tube) est de 0, 5 ml. La pression qui s'exerce sur les cellules épithéliales est très faible (2, 5 mm d'eau) et en sens inverse de celle exercée avec notre technique volumétrique. Une pesée est effectuée toutes les trois minutes. Nous observons dès l'établissement de la différence de pression osmotique un flux très important qui redescend vers une valeur d'équilibre trois fois plus faible environ (Figure 23). Cette importance de l'effet retour doit être corrigée pour tenir compte du fait que le flux d'eau entraîne une certaine dilution de la solution qui baigne la face séreuse. Cette dilution peut être calculée, elle est en moyenne de 20 °/$_o$ dans la série expérimentale dont les valeurs sont données dans la Figure 23.

Le fait que le même processus de régulation soit observé par la méthode gravimétrique avec une pression hydrostatique très faible (0, 25 cm d'eau) et appliquée en sens inverse, tend à prouver que, dans de bonnes conditions, la pression hydrostatique et son sens n'interfèrent pas avec l'évolution du flux net d'eau.

VI. 3. 2 - Influence des couches non agitées

Si le phénomène décrit plus haut n'est pas un artefact dû à l'existence d'une certaine pression hydrostatique exercée sur la préparation, il est important de s'assurer qu'il n'est pas lié non plus à l'influence des couches non agitées. Ces couches interviennent tout particulièrement

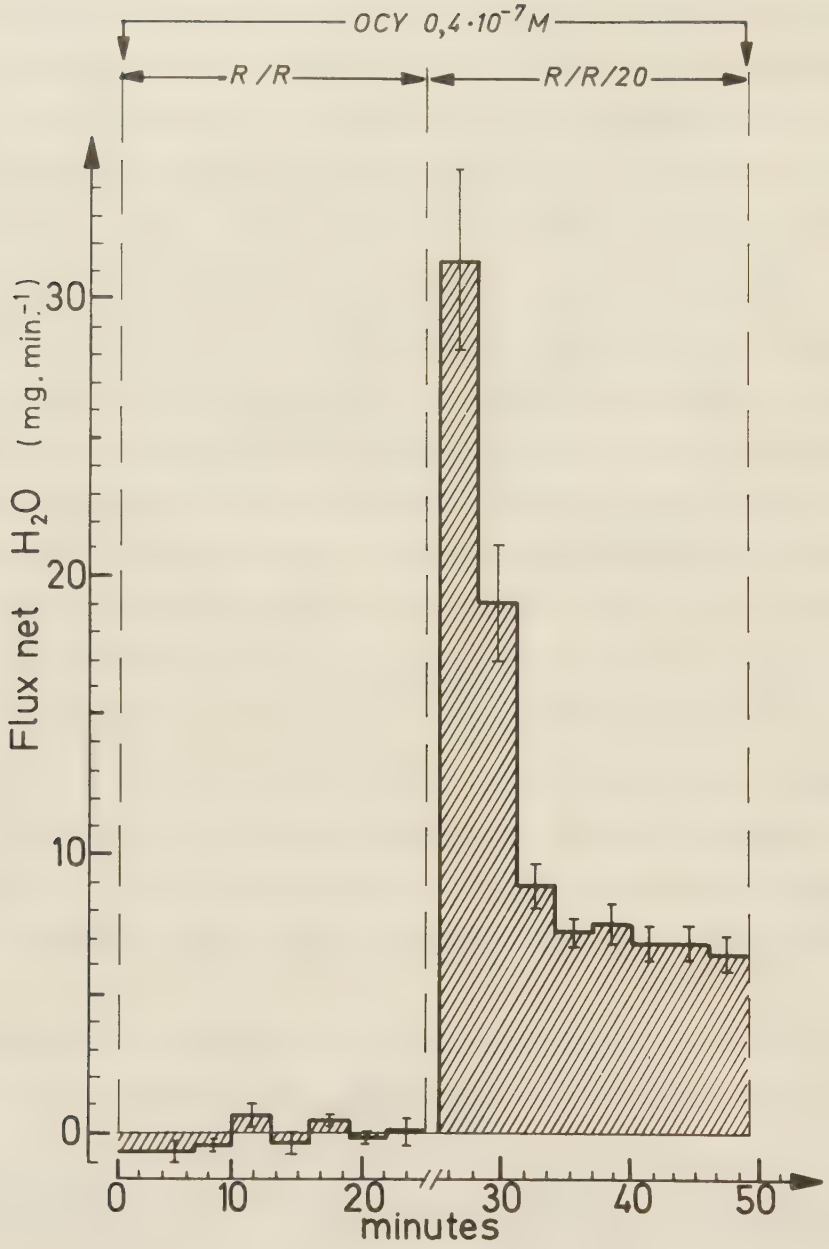


Figure 23

Evolution du flux net d'eau après l'établissement d'une différence de pression osmotique en présence d'ocytocine. Le flux net d'eau est mesuré par la technique gravimétrique de BENTLEY et correspond au flux à travers 2 cm^2 de surface apparente.

à deux moments : lors de l'établissement de la différence de pression osmotique d'une part, lorsque le flux net d'eau transépithélial est très important d'autre part.

Nos observations montrent que l'effet du gradient s'installe très rapidement, dès la minute qui suit son établissement. Si ce gradient était très long à s'établir, la montée du flux net d'eau serait plus lente. Le mélange du compartiment muqueux jusqu'au voisinage de la surface apicale de l'épithélium semble donc efficace.

Lorsque le flux net d'eau est très important, deux processus apparaissent :

1 - une accumulation d'électrolytes au niveau de la face apicale,

2 - une dilution des couches voisines de la face séreuse.

Ces effets tendent à diminuer le gradient et donc le flux net d'eau. Nous avons atténué l'importance du premier processus en utilisant de l'eau distillée dans le compartiment muqueux. Par contre, il est difficile d'éliminer l'effet de dilution à la face séreuse. L'agitation n'est réalisée que par barbotage d'air dans ce compartiment. Si l'on se réfère aux travaux de SHA'AFI et al. (115) qui estiment l'importance des couches non agitées par le temps nécessaire à la rétraction des globules rouges sous l'action des milieux hypertoniques, le temps d'équilibration est, avec une bonne agitation, de quelques dixièmes de seconde lors d'un changement de milieu. Il est donc peu probable que dans notre cas, cette équilibration nécessite une quinzaine de minutes (temps nécessaire au retour à l'équilibre).

Deux autres arguments confirment que l'influence des couches non agitées ne peut expliquer le phénomène observé.

Le premier argument résulte de l'observation de préparations fixées par la glutaraldéhyde. Une série de vessies ont été incubées dans des solutions de Ringer, stimulées pendant 15 minutes par l'ocytocine puis, toujours en présence d'ocytocine, fixées par une solution de glutaraldéhyde à 2 °/₀ ; enfin, le gradient de pression osmotique est établi : solution de Ringer + ocytocine contre solution de Ringer/20. Nous observons (Figure 22) un flux élevé mais il n'y a plus trace de pic élevé avec retour à une valeur d'équilibre. Nous pensons que le flux observé correspond à la perméabilisation maximale de la préparation avant le retour à une valeur d'équilibre. Le fait que le flux soit relativement faible par rapport à l'expérience effectuée sur le tissu non fixé semble dû à une action propre du fixateur. JARD et al. (65) ont, en effet, montré que la fixation par la glutaraldéhyde d'une vessie perméabilisée entraîne une diminution d'environ 40 °/₀ de sa perméabilité osmotique à l'eau.

De plus, nous avons observé des phénomènes d' "overshoot" dont l'amplitude maximale du pic était de la grandeur du flux observé sur la vessie fixée par la glutaraldéhyde (voir, par exemple, la Figure 21). Dans les deux cas il existait des couches non agitées ; si elles étaient responsables de la diminution du flux, cette dernière devrait apparaître aussi bien sur la vessie fixée que sur la vessie non fixée, ce qui n'est pas le cas.

Le deuxième argument est que cet effet de dépassement et de retour à une valeur d'équilibre existe avec la même intensité relative pour des flux d'importance très variable sur une même vessie, or la diminution du gradient n'a pas toujours été la même.

VI.3.3 - Influence du gonflement cellulaire

Un autre type d'artefact pourrait intervenir dans nos mesures : le gonflement des cellules épithéliales au moment de l'établissement de la

différence de pression osmotique. En effet, dans notre technique, le volume du compartiment muqueux est limité par la toile de nylon, la préparation étant incluse dans le compartiment. Toute augmentation du volume occupé par le tissu réduit d'autant le flux net d'eau apparent.

Trois remarques permettent d'exclure cette possibilité :

1°- le temps de gonflement des cellules sous l'influence d'un milieu hypotonique est en général très rapide et probablement de quelques secondes ; si l'on se réfère, par exemple, aux travaux de CAPUTO sur le gonflement de la fibre musculaire en présence de milieux hypotoniques (23) ;

2°- l'intégrale du pic du flux d'eau, compris entre l'établissement du flux et le moment où il a atteint sa valeur d'équilibre, représente une variation de volume qui peut atteindre jusqu'à 7 fois le volume du tissu au repos ;

3°- le phénomène est observé également avec la technique gravimétrique de BENTLEY ; dans ce cas, l'augmentation du volume des cellules n'intervient pas dans la mesure.

VI.4 - INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Un autre argument en faveur d'une action spécifique de l'hypotonicité est l'influence de la température sur le retour à une valeur d'équilibre. La Figure 24 représente deux enregistrements effectués à 10°C et à 22°C. Nous pouvons remarquer que le temps nécessaire pour que le retour vers la valeur d'équilibre soit réalisé à 50 °/₀, est de 7 minutes environ à 22°C et de 15 minutes à 10°C. Sur une série de préparations incubées à 15°C et 25°C des moyennes des T 1/2 des retours sont respectivement : 16,55 $\pm$ 2,55 minutes et 4,83 $\pm$ 0,86 minutes (n = 5). Cette différence dans le temps de réponse fait apparaître un Q 10 égal à 3,42 qui témoigne de l'intervention d'un processus à énergie d'activation élevée.

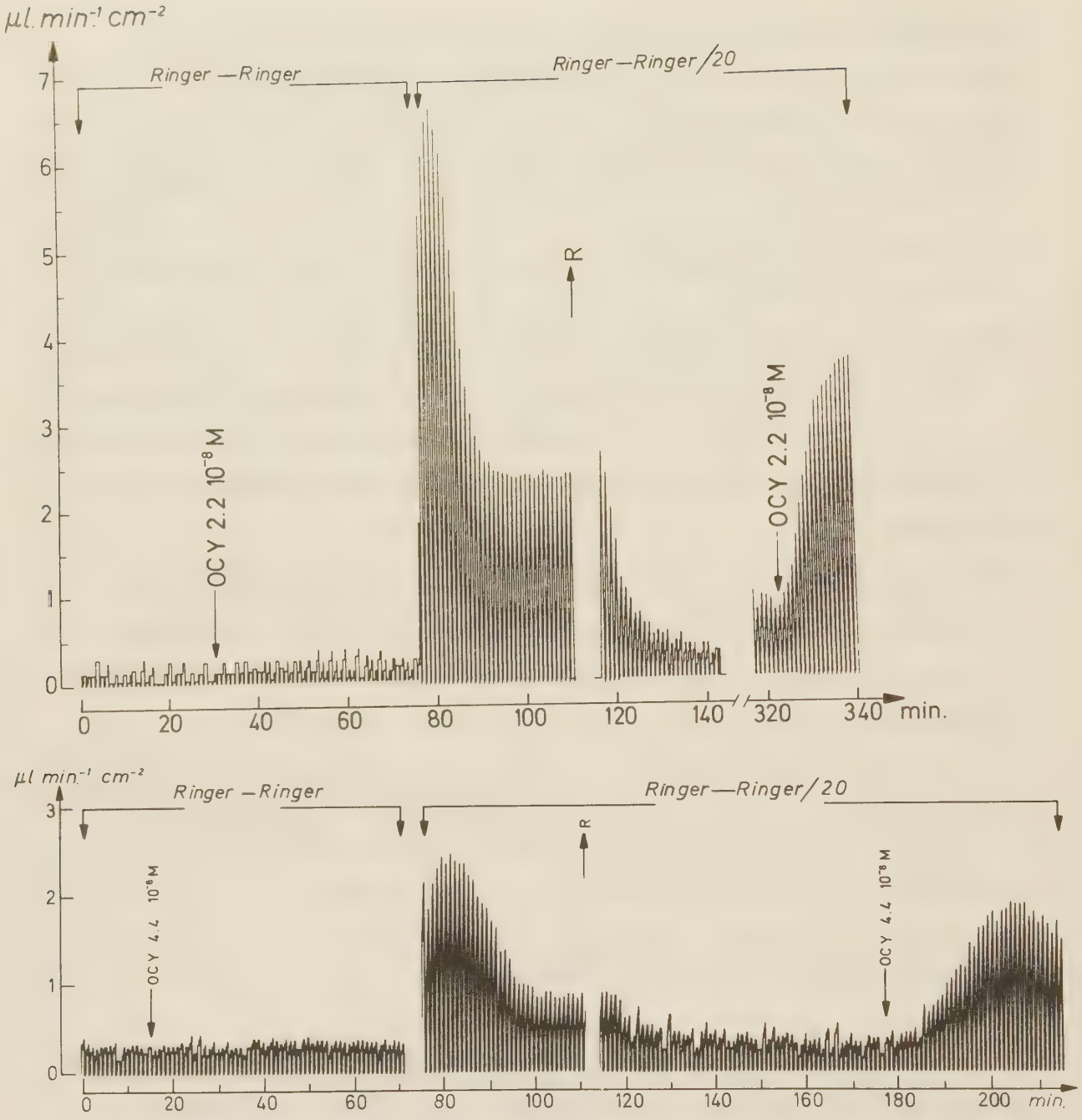


Figure 24

Influence de la température d'incubation sur la cinétique de retour à une valeur d'équilibre après l'établissement rapide d'une différence de pression osmotique. Enregistrements d'expériences effectuées à 22°C (tracé du haut) et à 10°C (tracé du bas).

VI.5 - INFLUENCE DE PRESSIONS OSMOTIQUES VARIABLES

Si le flux net d'eau entraîne une hypotonicité cellulaire qui peut être la cause du retour à une valeur d'équilibre basse, il semble que nous pouvons la réduire, ou même l'annuler, en établissant la différence de pression osmotique à un niveau où le compartiment séreux est hypertonique. Dans la série expérimentale suivante, les vessies ont été stimulées par l'ocytocine dans des conditions d'isotonicité (solution de Ringer des deux côtés). Ensuite, un gradient a été établi soit en Ringer/Ringer/2, en Ringer + mannitol 110 mOsm/Ringer/2 + mannitol 110 mOsm ou encore en Ringer/2/Ringer 20 (Figure 25).

L'établissement d'une différence de pression osmotique à un niveau hypotonique (Ringer/2/Ringer/20) entraîne initialement un flux net d'eau important, comparable à celui du groupe témoin, suivi d'un retour à une valeur très basse dû au fait que l'épithélium est maintenu dans un milieu hypotonique. Bien que non physiologique, cette situation ne semble pas affecter la préparation, au moins quant à sa sensibilité à l'hormone neurohypophysaire puisque les réponses hydrosmotiques à l'ocytocine sont normales après ce traitement.

Par contre, lorsque la préparation est dans des conditions hypertoniques qui habituellement n'entraînent pas de réponse hydrosmotique (cf. V.6.2), le flux n'atteint plus la même amplitude initiale et il n'y a plus de retour à une valeur d'équilibre. Nous nous attendions à ce que le flux s'établisse à une valeur élevée et s'y maintienne. Cette absence d' "overshoot" est probablement due à un effet osmotique très rapide de l'hypertonicité. Dans la minute qui suit l'établissement du gradient osmotique élevé, la diminution du volume cellulaire, par exemple, et l'apparition d'une pression osmotique élevée dans ces cellules s'opposeraient à l'établissement d'un flux important et d'un processus de régulation. Le mécanisme exact de cette intervention extrêmement rapide de l'hypertonicité reste obscure.

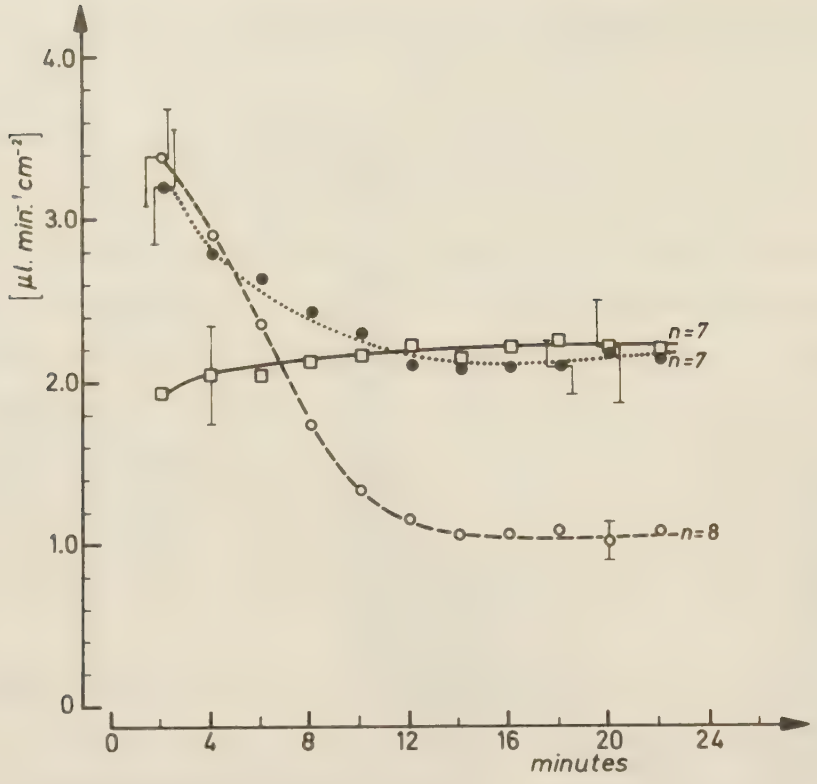


Figure 25

Evolution du flux net d'eau à travers des vessies incubées dans des solutions de Ringer, stimulées par l'ocytocine ($2,2.10^{-8}$ M) pendant 20 minutes, puis soumises à l'application de différences de pression osmotique comparables mais à des niveaux de pressions osmotiques absolues de plus en plus élevées : passage en Ringer/2 / Ringer/20 (cercles ouverts), passage en Ringer/Ringer/2 (cercles noirs), passage en Ringer + mannitol 110 mOsm/Ringer/2 + mannitol 110 mOsm (carrés).

L'origine artefactuelle du phénomène d' "overshoot" paraissant exclue, nous sommes donc conduits à admettre que les variations du flux net d'eau observées traduisent bien une réduction de la perméabilité à l'eau et donc que le flux net d'eau exerce une rétroaction sur les mécanismes de contrôle de la perméabilité à l'eau.

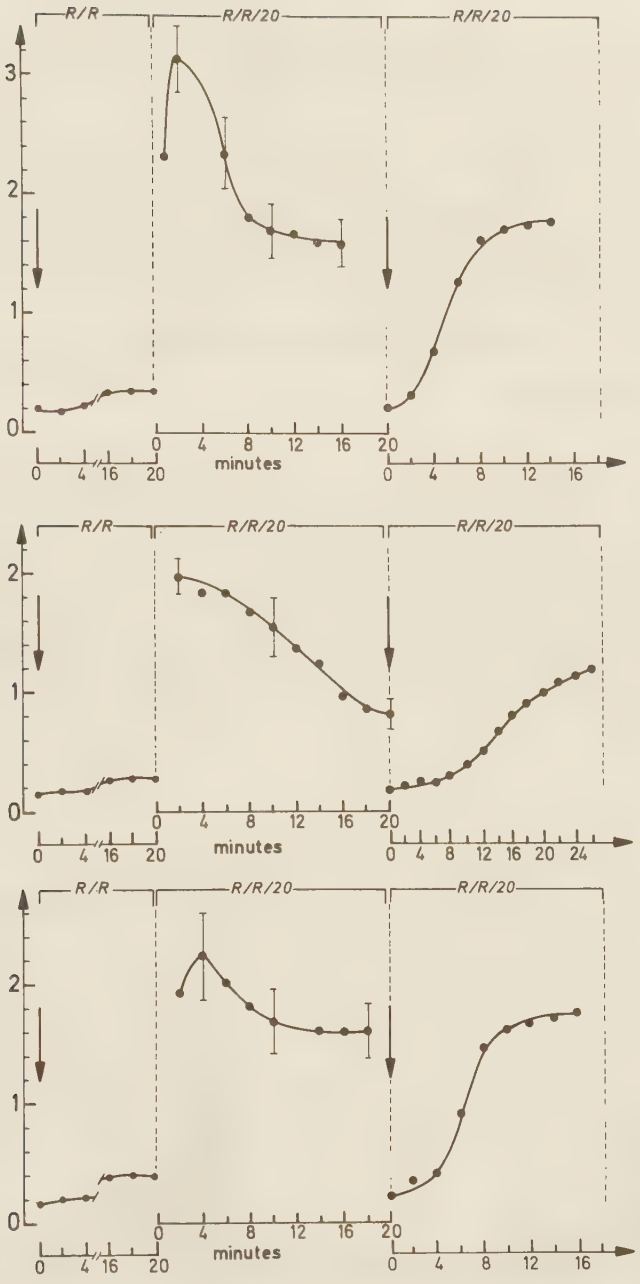


Figure 26

Evolution du flux net d'eau après l'application rapide d'une différence de pression osmotique transépithéliale à travers la vessie préalablement exposée à l'ocytocine $2,2.10^{-8}$ (en haut), à la théophylline 10^{-2} M (au centre), à l'AMP_c exogène 10^{-2} M (en bas).

VI. 6 - POINT D'INSERTION DE LA BOUCLE

Nous avons essayé de préciser à quelle étape se situe le rebouclage, et dans ce but, nous avons recherché si ce même phénomène peut se retrouver lors de stimulations de l'accroissement du flux net d'eau par d'autres substances impliquées dans le système : la théophylline et l'AMP_c exogène.

La Figure 26 présente l'ensemble des résultats. Dans tous les cas nous observons un phénomène d' "overshoot", avec un retour plus lent sous l'action de la théophylline, plus faible avec l'AMP_c exogène. Si, par contre, théophylline et AMP_c sont ajoutés ensemble, l'effet régulateur

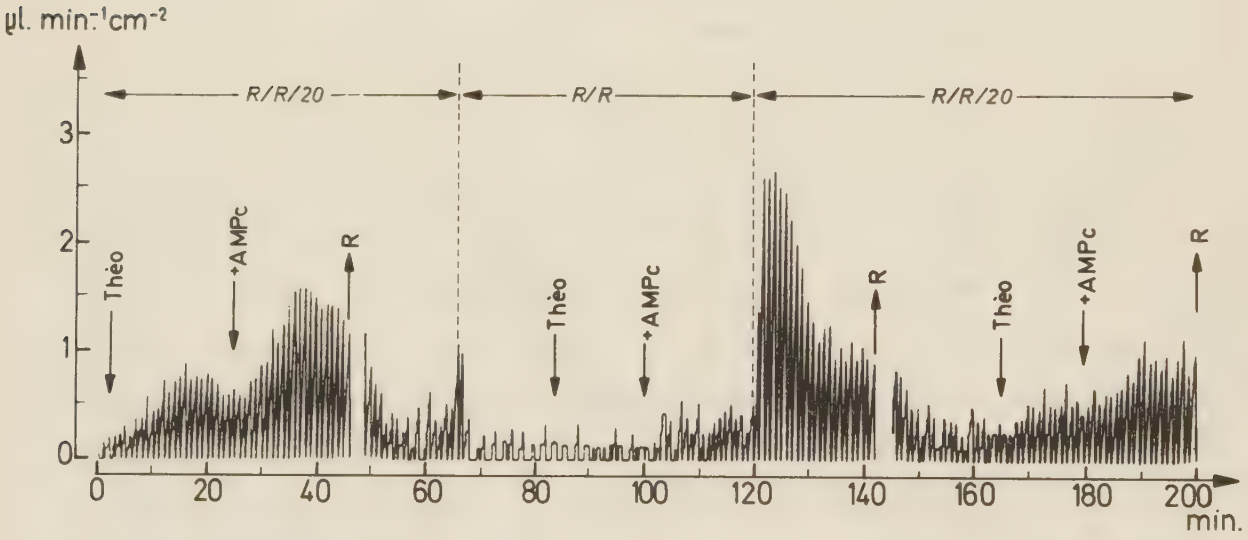


Figure 27

Un enregistrement de l'évolution du flux net d'eau après application rapide d'une différence de pression osmotique à travers la préparation stimulée au préalable par la théophylline 2.10^{-4} + AMP_c 5.10^{-3} M (Contrôles avant et après).

présente la même allure générale qu'avec l'ocytocine (Figure 27). L'ensemble des variations que nous venons de décrire ne permet pas cependant de préciser si le rebouclage se situe au niveau de la phosphodiestérase ou à un niveau postérieur tel que celui où nous nous proposons de faire intervenir l'action des milieux hypertoniques, par exemple.

VI.8 - CONCLUSION

Il était important, avant de rechercher la signification de cet effet de dépassement, d'écarter toute possibilité d'origine artefactuelle. Les expériences que nous venons de décrire indiquent que ni la pression hydrostatique impliquée, ni la présence de couches non agitées, ni les variations de volumes cellulaires ne peuvent rendre compte des variations de flux observées.

Elles conduisent à penser que c'est bien la perméabilité de la préparation qui varie et que cette variation est commandée à partir d'une étape voisine de l'étape finale : l'augmentation du flux net d'eau. Quelques observations de l'évolution de la réponse hydrosmotique sur des temps plus longs viennent illustrer ce processus de rétroaction du flux d'eau sur lui-même que nous venons de mettre en évidence.

CHAPITRE VII

PRESENCE D'OSCILLATIONS AU COURS DE LA REPONSE HYDROSMOTIQUE

VII.1 - INTRODUCTION

Le processus d'auto-inhibition du flux net d'eau que nous venons de décrire dans les conditions bien définies de l' "overshoot" semble se produire également lors des stimulations classiques où une différence de pression osmotique transépithéliale existe préalablement à la stimulation hormonale. Le flux net d'eau qui apparaît dans ces conditions crée une hypotonicité de l'assise épithéliale et est susceptible d'entraîner une auto-inhibition. Celle-ci se traduirait par l'apparition d'oscillations dans la réponse.

VII.2 - DESCRIPTION DES OSCILLATIONS

Dans la plupart des expériences analysées plus haut, nous avons considéré la cinétique de variation du flux net d'eau jusqu'à l'accroissement maximum de ce flux et, très souvent, d'ailleurs, nous avons enlevé l'agent actif, dès que le flux était maximal. Si nous laissons évoluer le flux net d'eau en fonction du temps lors d'une stimulation par l'ocytocine par exemple, nous observons dans certains cas des oscillations amorties du

flux. La Figure 28 est un enregistrement d'une expérience où de telles oscillations sont particulièrement nettes. On notera toutefois qu'elles peuvent prendre des formes variées comme le montrent les deux types d'oscillations observées sur deux fragments de la même vessie (Figure 18). D'une manière générale, la fréquence de ces oscillations est constante, la période est de l'ordre de 9 minutes à température ambiante.

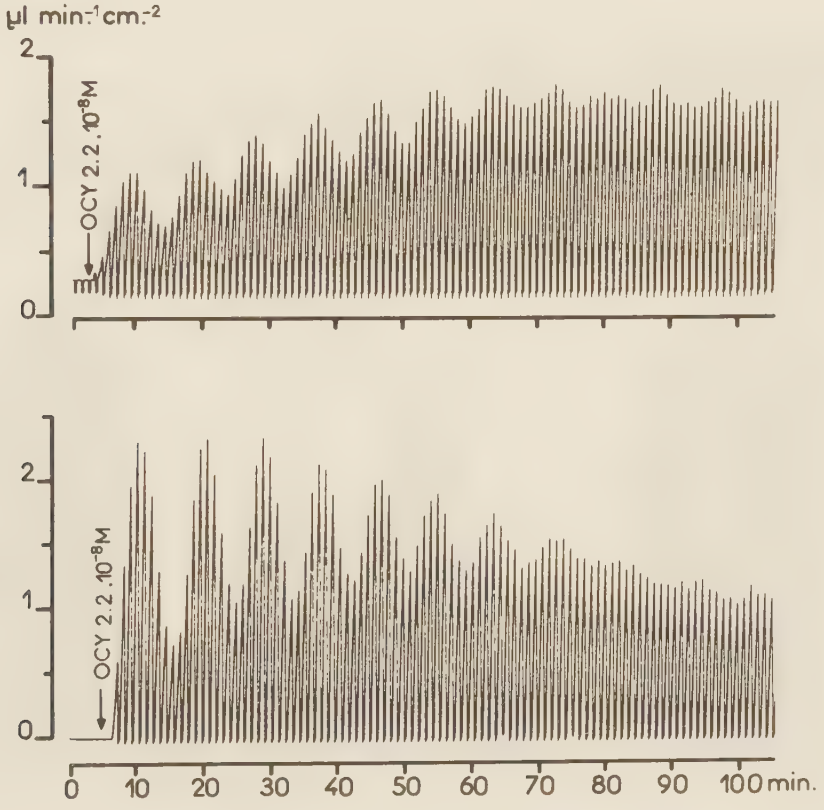


Figure 28

Evolution du flux net d'eau dans deux fragments de la même vessie stimulée par l'ocytocine.

VII. 3 - DEPENDANCE DE LA TEMPERATURE

Comme le phénomène d' "overshoot", ces oscillations sont dépendantes de la température (Figure 29). Cette dépendance est du même ordre de grandeur que celle de l'effet de rétroaction ou de la cinétique d'accroissement du flux. A très basse température, les oscillations n'apparaissent plus (Figure 30).

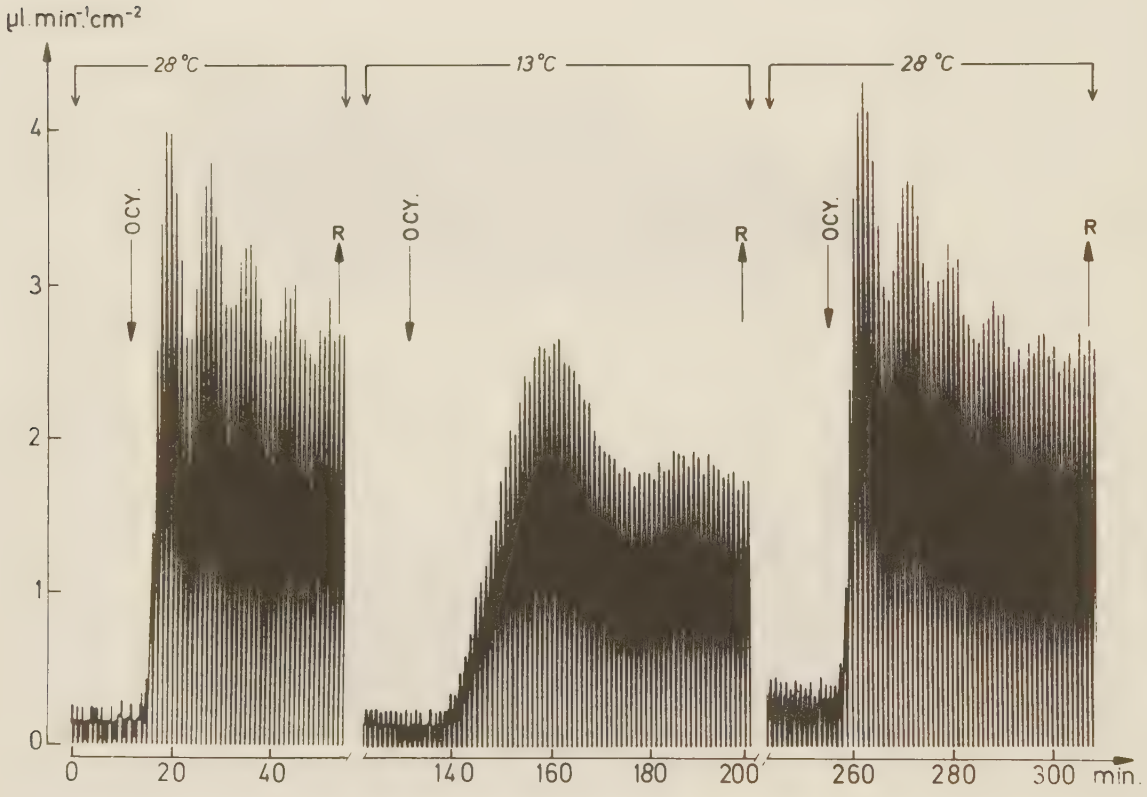


Figure 29

Enregistrement de l'évolution du flux net d'eau sur une même préparation stimulée par l'ocytocine $4,4.10^{-8}$ M et incubée à 28°C, puis à 13°C et retour à 28°C. " R " représente le moment où l'hormone est enlevée du milieu séreux. Le changement de température s'effectue dans les minutes qui suivent le rinçage.

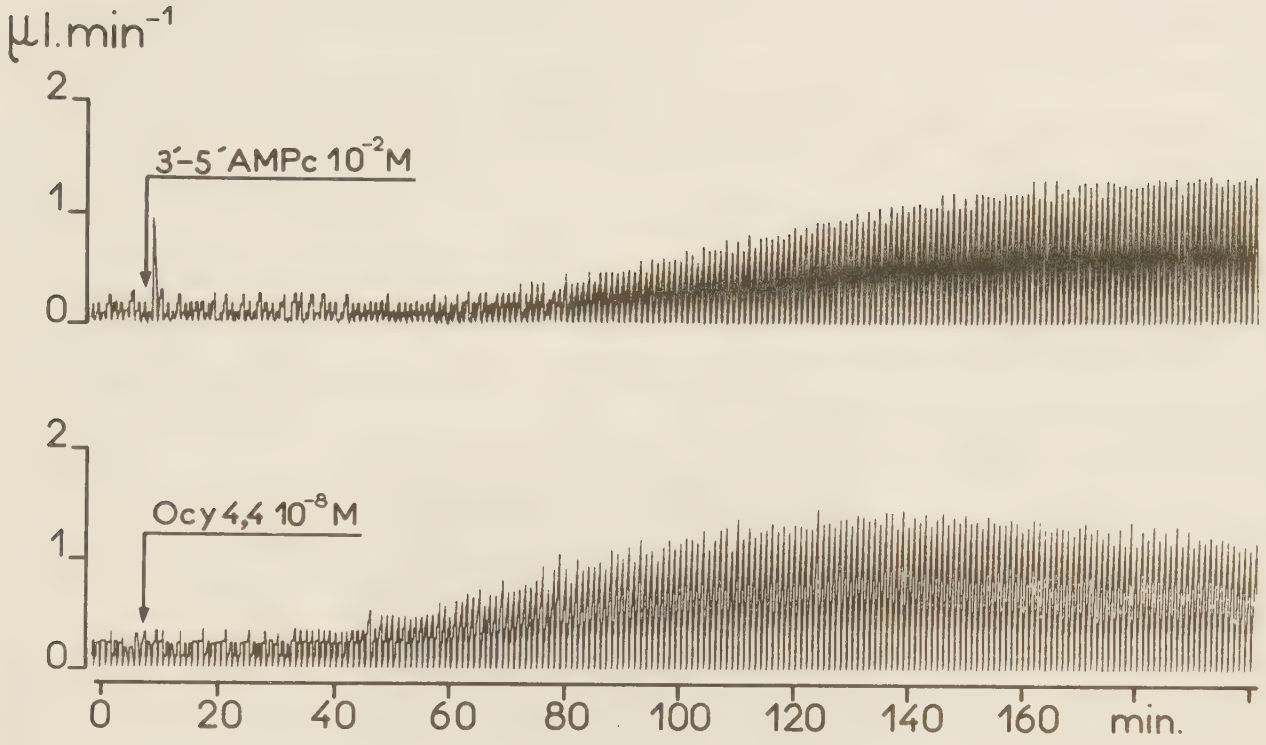


Figure 30

Evolution du flux net d'eau à travers une préparation incubée à 2°C et stimulée soit par l'ocytocine, soit par l'AMP_c.

VII. 4 - EFFET DE LA MUSCULATURE

Nous savons que les hormones neurohypophysaires agissent également sur la musculature lisse de la vessie (44). Cette action peut-elle être à l'origine des oscillations observées ? Dans le but de répondre à cette question nous avons réalisé l'expérience suivante : nous avons stimulé la voie contrôle d'une préparation par l'ocytocine ($2,2.10^{-8}$ M) et la voie expérimentaleparla vasotocine (AVT) ($0,7.10^{-9}$ M). Si, comme le montre la Figure 31, ces concentrations sont équivalentes en ce qui concerne leur activité hydrosmotique, elles diffèrent par contre d'un facteur 200, en ce qui concerne leur activité sur la musculature lisse

(compte tenu de la différence d'un facteur 6 dans leurs activités ocytocique sur l'utérus de rat). Nous observons néanmoins que la réponse hydrosmotique du fragment traité par l'AVT présente également des oscillations.

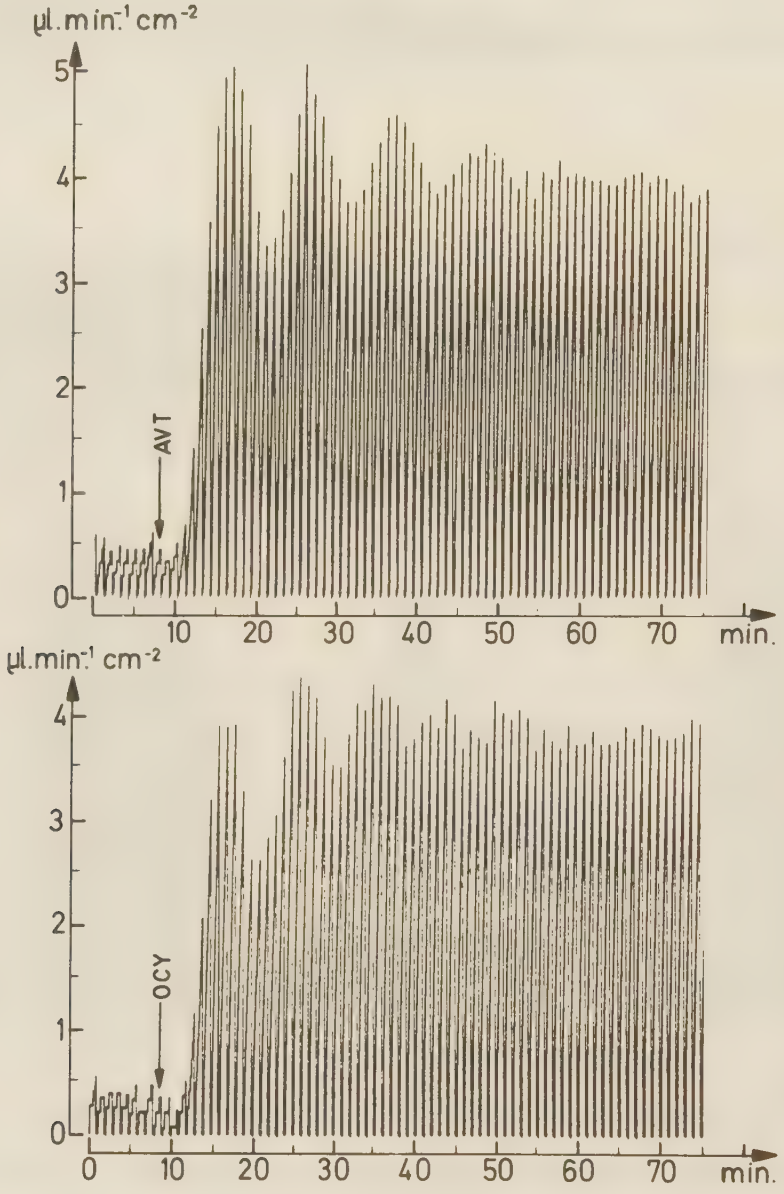


Figure 31

Evolution du flux net d'eau à travers deux fragments d'une même vessie ; le tracé du haut : stimulation par l'AVT ($0,7.10^{-9}$ M) ; tracé du bas : stimulation par l'ocytocine ($2,2.10^{-8}$ M).

VII. 5 - REAJUSTEMENTS A UNE NOUVELLE VALEUR D'EQUILIBRE

On remarque ce même type d'oscillations sur les réajustements de flux à une nouvelle valeur d'équilibre. Ainsi, lorsqu'une préparation perméabilisée par l'ocytocine est soumise à l'action d'un inhibiteur tel que la noradrénaline ou la prostaglandine E_1, le flux net d'eau est partiellement réduit et il s'établit à une nouvelle valeur d'équilibre après quelques oscillations amorties (Figure 32).

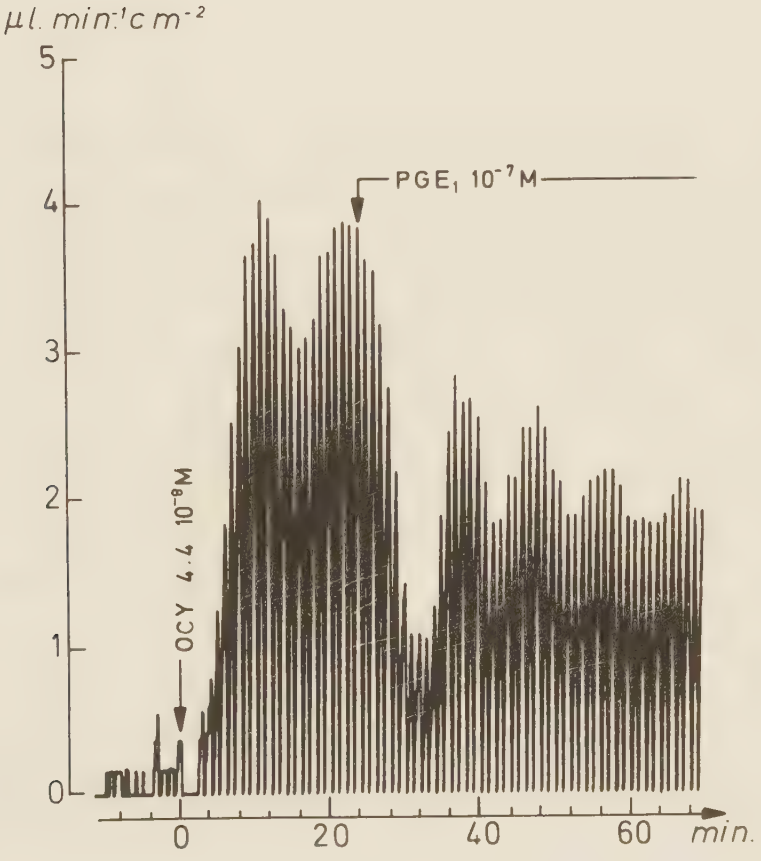


Figure 32

Enregistrement de l'évolution du flux net d'eau à travers une préparation stimulée par l'ocytocine (OCY) puis inhibée par la prostaglandine E_1 (PGE_1).

VII. 6 - CONCLUSION

L'observation de ces oscillations n'est pas compatible avec un caractère linéaire du système étudié et confirme l'hypothèse d'une boucle proposée plus haut pour rendre compte du phénomène d' "overshoot". Comme en témoigne la variabilité d'amplitude des oscillations observées d'un fragment à l'autre de la même vessie, la complexité du phénomène s'avère telle qu'on ne peut plus guère espérer prévoir le comportement du système d'une manière intuitive et sans recourir à un modèle.

CHAPITRE VIII

DISCUSSION GENERALE

L'incubation de la vessie de grenouille dans des milieux hypertoniques altère ses propriétés physiologiques et particulièrement sa perméabilité à l'eau. Il semble que ces altérations sont le résultat d'une réduction de volume d'un compartiment osmosensible, probablement le compartiment cellulaire. En effet, alors que l'addition de mannitol ou de NaCl, solutes qui pénètrent difficilement dans les cellules, provoque un accroissement important de la perméabilité à l'eau de cette structure, l'addition d'urée à la même concentration que les autres solutes est pratiquement sans effet.

Comment l'altération d'un compartiment osmosensible peut-elle intervenir sur les variations de la perméabilité à l'eau ? Certains processus non spécifiques doivent être envisagés ; par exemple, la réduction du compartiment cellulaire pourrait provoquer des modifications mécaniques des différents types de membranes et des jonctions intercellulaires ou encore entraîner des variations importantes de la concentration de nombreux composés dans ce compartiment. Aucune modification ultrastructurale n'indique l'existence d'une altération mécanique. En effet, l'observation de l'épithélium vésical incubé en présence de mannitol du

côté interne, semble indiquer que la barrière apicale reste intacte. Les images en microscopie électronique montrent en particulier que les barres terminales entre les cellules sont régulières et fermées. Il est possible, toutefois, que des altérations au niveau des membranes ou des jonctions cellulaires ne soient pas détectables par cette technique (54). Cependant le fait que la perméabilité au mannitol ^{14}C reste très faible dans ces conditions est un argument supplémentaire en faveur d'une bonne préservation des barres terminales.

On notera au passage qu'il y a une différence importante entre ces observations et celles effectuées lors de l'action de milieux hypertoniques externes. Dans ce dernier cas, comme nous l'avons vu, le flux s'accroît faiblement et lentement et il semble que les mécanismes d'accroissement de la perméabilité ne soient pas les mêmes. Les cellules présentent une structure très modifiée avec apparition de grosses vacuoles dans le cytoplasme et surtout une altération des barres terminales qui semblent moins strictement closes et présentent de petites vésicules.

Comme nous l'avons observé, en présence d'un milieu hypertonique séreux, les espaces intercellulaires sont fortement dilatés. Ces espaces jouent parfois un rôle important dans l'établissement d'un flux net d'eau transépithélial (38 , 39). Dans les conditions où nous observons la vessie de grenouille, la dilatation des espaces est vraisemblablement due à la rétraction des cellules sous l'influence de l'hypertonicité. Cette dilatation n'est pas liée au flux comme le prouve le fait que ce phénomène est observé dès l'addition du mannitol avant même que le flux net d'eau ne se développe.

Il semble donc difficile d'expliquer par le seul biais de modifications physiques le flux observé sous l'action des milieux hypertoniques.

Si les modifications mécaniques et physiques qu'entraînent les milieux hypertoniques ne peuvent rendre compte des effets obtenus sur la perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille, l'idée d'une action plus spécifique s'impose par l'observation de plusieurs points de ressemblance entre les cinétiques de réponse au mannitol et à l'ocytocine.

Tout d'abord, l'allure générale de la cinétique d'accroissement du flux net d'eau est comparable dans les deux cas. Elle est caractérisée par la présence d'une période de latence de quelques minutes suivie du développement rapide du flux (Notons toutefois que le T 1/2 est plus long dans le cas de l'hypertonicité). En deuxième lieu, cette cinétique du développement du flux net d'eau est dépendante de la température, que ce flux soit dû à l'action de l'ocytocine ou à celle des milieux hypertoniques. Les Q_{10} sont voisins, ce qui laisse supposer que les étapes dépendantes de la température sont de même nature dans l'un et l'autre cas. Enfin, l'adaptation des animaux à basse température produit les mêmes effets sur les réponses à l'hormone et à l'hypertonicité, ce qui montre que certains facteurs qui agissent sur un stimulus, agissent également sur l'autre.

Ces observations suggèrent que les deux stimuli empruntent au moins partiellement des voies communes pour augmenter la perméabilité à l'eau de la vessie.

Une interaction entre des modifications du système cyclasique et la réponse aux milieux hypertoniques renforce l'hypothèse d'une action spécifique des milieux hypertoniques, action qui s'effectuerait en partie via les mêmes voies que l'action hormonale.

Deux inhibiteurs de l'adénylcyclase sur cette structure, noradrénaline et PGE_1, réduisent la réponse aux milieux hypertoniques. Cette observation apporte sans doute l'argument le plus convaincant d'une interférence entre les mécanismes d'action de l'hormone et de l'hypertonicité.

Une analyse plus complète de l'inhibition des milieux hypertoniques par la noradrénaline ou la PGE_1 fait cependant ressortir deux différences importantes :

1°- la réponse hydrosmotique à l'addition de mannitol ou de NaCl est ralentie en présence d'inhibiteur, ce qui n'est pas le cas lors de la réponse à l'hormone.

2°- lorsque la réponse est développée, l'inhibiteur n'est vraiment actif que sur l'action hormonale. En effet, la noradrénaline et la PGE_1 n'ont pratiquement plus d'action inhibitrice lorsque la réponse aux milieux hypertoniques a atteint son maximum. Sans doute, dans certains cas observons-nous une faible inhibition mais elle n'est pas quantitativement comparable à l'inhibition qui apparaît lorsque l'inhibiteur est présent dans le bain d'incubation avant l'addition du mannitol ou de NaCl.

Cette assymétrie ne peut résulter d'une inactivation de l'inhibiteur de la cyclase après une action prolongée des milieux hypertoniques. En effet, la réponse à l'addition d'hormone au maximum de l'effet de l'hypertonicité est encore inhibée par les catécholamines.

Ces différences de réaction aux inhibiteurs de l'adénylcyclase dans les deux conditions expérimentales impliquent que les deux stimuli ont des sites d'action différents. Le fait que la réponse aux milieux hypertoniques échappe à l'influence des inhibiteurs de la cyclase lorsque cette réponse est développée, suggère plus précisément que l'élévation de la

concentration cellulaire en AMP_c n'est pas, lors de l'action des milieux hypertoniques, le facteur déterminant de la réponse.

Cette absence d'élévation de la concentration d'AMP_c constituerait ainsi une caractéristique de la réponse aux milieux hypertoniques qui la différencierait de la réponse à l'hormone antidiurétique au cours de laquelle se produit un accroissement rapide et important de la concentration du nucléotide (51).

Le fait que la réponse au mannitol et au NaCl soit significativement plus lente que la réponse à l'ADH, pourrait être liée à cette absence d'élévation de la concentration cellulaire en AMP_c. On constate, en effet, que l'inhibition de l'adénylcyclase ralentit davantage la réponse et que cet effet est corrigé par l'AMP_c exogène.

Ces résultats indiquent aussi que la variation de concentration d'AMP_c, susceptible d'être provoquée par la diminution du volume cellulaire ne joue pas un rôle important dans la réponse aux milieux hypertoniques. On notera, à ce sujet, que deux propriétés physiologiques au moins devraient être affectées par les variations du contenu des cellules en AMP_c : le transport de sodium et le flux net d'eau. Nous avons observé que le transport de sodium, estimé par le courant de court-circuit, est fortement inhibé dès la première minute après l'addition du mannitol au compartiment séreux alors que le flux net d'eau est au contraire accru mais beaucoup plus lentement avec un effet retard de plusieurs minutes. Bien que les réponses natriférique et hydrosmotique aux hormones neurohypophysaires impliquent des récepteurs hormonaux différents (12 , 90) et probablement des "pools" séparés d'AMP_c, il est difficile d'imaginer qu'un accroissement global de la concentration tissulaire en AMP_c entraîne des effets contraires si ce n'est en admettant que les milieux hypertoniques exercent simultanément un effet négatif sur le transport de sodium.

En résumé, il apparaît clairement que les milieux hypertoniques ont une action spécifique sur la vessie de grenouille ; que certaines étapes qui conduisent à l'accroissement de la perméabilité à l'eau de cette structure sont communes à l'hypertonicité et à la stimulation hormonale et, enfin, qu'il ne s'agit pas d'une action au niveau des toutes premières étapes bien qu'elles puissent interférer avec la réponse aux milieux hypertoniques.

Nous avons exclu l'hypothèse d'une action au niveau de la cyclase à partir des différences observées dans les inhibitions des réponses à ces deux stimuli ; nous écartons également une action de l'hypertonicité au niveau de la phosphodiestérase en nous basant sur le fait que la réponse à la théophylline est inhibée, qu'elle soit développée ou non, par les catécholamines et que, par ailleurs, les effets de cette méthylxantine sont potentialisés par l'addition de mannitol ; il n'y a pas simple addition des effets.

Nous pensons que les milieux hypertoniques agissent sur une étape postérieure à la production d'AMP_c et que nos résultats s'expliquent le mieux si l'on admet que leur action s'exerce au niveau d'une réaction d'équilibre entre un composé actif et un composé inactif, le composé actif étant responsable directement ou à travers d'autres étapes de l'accroissement de la perméabilité de la préparation. Nous pouvons établir une analogie entre ce mode d'action et celui par lequel l'AMP_c stimule une kinase responsable du passage d'une phosphorylase inactive à une phosphorylase active (réaction qui est également réversible sous l'action d'une phosphatase). C'est le cas par exemple dans la glycogénolyse sous l'action des catécholamines (SUTHERLAND et al., 118) et dans de nombreuses autres actions hormonales où l'AMP_c est impliquée (30 , 68 , 73). Dans le processus de perméabilisation de la vessie, l'AMP_c accélérerait la production de l'intermédiaire actif, alors que les

milieux hypertoniques bloqueraient le retour vers le produit inactif (figure 33). Dans cette hypothèse le ralentissement de la réponse au mannitol observé en présence de noradrénaline s'explique par le fait que la production de A est très faible et le blocage de sa destruction n'empêche pas qu'il soit un facteur limitant de la cinétique de développement de l'effet biologique. De même, lorsque l'action est développée, la concentration de A est grande et l'inhibition de sa production n'est plus un facteur limitant.

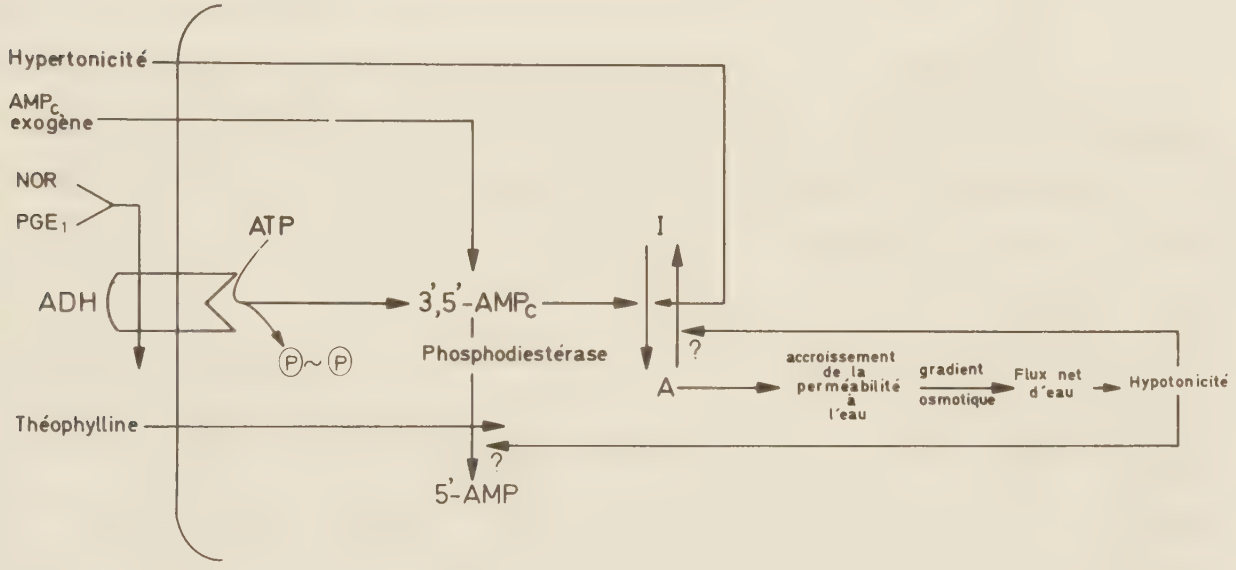


FIGURE 33

Schéma de la boucle régulatrice de la perméabilité à l'eau. Deux possibilités de point de retour pour l'hypotonicité.

L'observation de la réversibilité des réponses hydrosmotiques à l'hormone, à la théophylline et à l'AMP_c en milieu hypertonique confirme cette hypothèse. Le temps de retour au flux de base après rinçage de la substance qui a entraîné une réponse hydrosmotique est constant dans les conditions normales. Si la préparation est incubée en présence de 110 mOsm de mannitol ajouté aux solutions qui baignent les

faces muqueuse et séreuse (cette hypertonicité ne provoque pas un effet propre) la réversibilité des réponses est plus lente d'un facteur 2 environ.

Ainsi, une étape supplémentaire, postérieure à l'accumulation de l'AMP_c et contrôlée par un compartiment tissulaire osmosensible pourrait exister dans la chaîne des réactions qui conduisent de l'action de l'hormone neurohypophysaire à l'accroissement de la perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille.

Si les variations de pressions osmotiques dans le sens de l'hypertonicité ont une influence très grande sur la perméabilité à l'eau, il est important de remarquer que des variations osmotiques en sens opposé, vers l'hypotonicité, ont également une action sur cette perméabilité. C'est une situation d'autant plus intéressante que ces variations ont lieu lors de la réponse hydrosmotique aux hormones neurohypophysaires. D'après les images en microscopie électronique les cellules sont alors gonflées et remplies de vacuoles, les espaces intercellulaires sont dilatés. Par ailleurs, un flux très hypotonique, pratiquement de l'eau, traverse la préparation (au maximum de la réponse, jusqu'à 4 fois l'équivalent en eau du volume des cellules épithéliales traverse la préparation par minute).

Dans ces conditions d'hypotonicité, nous observons une réduction du flux net d'eau à travers la préparation. Cette réduction est clairement démontrée dans les expériences où la vessie est stimulée dans des conditions d'isotonicité puis soumise au gradient osmotique. Le flux s'établit d'emblée à une valeur très élevée, supérieure à ce que nous aurions observé en stimulant la préparation préalablement soumise à ce gradient. Ensuite, le flux net d'eau diminue vers une valeur d'équilibre beaucoup plus basse.

Un tel type d'expérience indique qu'une plus grande perméabilité à l'eau peut être atteinte dans des conditions isosmotiques, autrement dit quand il n'y a pas de flux d'eau, ce dernier ayant probablement un effet auto-inhibiteur. Il reste à définir la nature du mécanisme mis en cause ici et son mode d'intervention.

Cette rétroaction n'est pas un phénomène purement physique, pensons-nous, puisque la phase de retour du flux net d'eau du pic vers sa valeur d'équilibre est fortement dépendante de la température. Cette dépendance de la température est du même ordre de grandeur que celle de la cinétique de réponse à l'hormone. Nous n'avons cependant pas d'autres arguments positifs pour confirmer que cet effet rétroactif est de nature biochimique. Aucune substance pharmacologique n'a permis, jusqu'à présent, de supprimer ou de réduire cette action.

L'évolution de la réponse hydrosmotique à l'hormone au cours du temps, révèle, si on l'examine de façon plus approfondie, certains aspects qui confirment l'existence d'un système rebouclé. Lorsque la stimulation hormonale est maintenue pendant un temps assez long, on observe en effet dans de nombreux cas des oscillations amorties du flux net d'eau. Ces oscillations semblent bien correspondre à un processus physiologique d'autant qu'elles sont dépendantes de la température comme la cinétique de réponse à l'hormone ou l'effet de l'hypotonicité. Or, ces oscillations impliquent nécessairement un processus de rétroaction et seraient probablement liées à l'hypotonicité engendrée par le flux.

Un argument en faveur d'une explication du phénomène oscillatoire par la boucle régulatrice est le fait que nous n'avons jamais observé d'oscillation lors de stimulation par les milieux hypertoniques. Sans doute nous avons un flux net d'eau comparable à celui obtenu sous l'action hormonale mais les cellules ont diminué de volume et la pression

osmotique intracellulaire est élevée, il n'y a plus alors de raison pour qu'intervienne la boucle régulatrice.

L'accroissement du flux net d'eau inhibe donc une des étapes de ses propres voies de contrôle, mais laquelle ? Nous serions tenté, par souci de simplicité et de symétrie, de faire agir l'hypotonicité au même niveau que l'hypertonicité. Ainsi nous aurions un système avec une boucle régulatrice dans lequel un effet retour pourrait s'exercer à partir de l'étape ultime de l'action hormonale sur une étape antérieure, l'hypotonicité agirait comme entrée négative dans ce système, réduisant la perméabilité à l'eau et limitant ainsi le déplacement vers l'hypo-osmolarité tissulaire. A l'inverse, l'hypertonicité interviendrait en entrée positive accroissant le flux net d'eau et limitant l'hyperosmolarité des tissus.

En fait le site de rebouclage dans le cas de l'hypotonicité n'est pas obligatoirement la réaction sur laquelle agissent les milieux hypertoniques. Nous avons montré que l'effet régulateur de l'hypotonicité peut également s'observer lorsque la préparation est stimulée par la théophylline, l'AMP_c exogène ou les deux ensemble ; ceci laisse entendre que le point d'impact de cette boucle régulatrice n'est probablement pas la cyclase. Nous n'avons pas d'arguments pour exclure le rebouclage au niveau de la phosphodiestérase qui serait alors activée par l'hypotonicité cellulaire (cf. Figure 31).

Nous ne pouvons cependant pas écarter définitivement un rebouclage au niveau de la cyclase. Il est possible, en effet, que l'AMP_c exogène qui prénètre mal dans les cellules (62 , 98 , 103) ne soit pas à lui seul responsable du flux observé mais que l'AMP_c endogène y contribue pour une part non négligeable. Le rebouclage pourrait s'effectuer dans une certaine mesure sur la production de cet AMP_c endogène. Un

inhibiteur de la cyclase ou un antagoniste de l'hormone (22 , 114) pourrait donc intervenir dans le processus de régulation.

KARLIN (70) et OWERWEG (95) ont décrit l'existence d'un relargage d'un inhibiteur de l'action hydrosmotique de l'hormone antidiurétique sous l'action de l'hormone elle-même. Dans une étape postérieure, cependant, KARLIN (71) a montré que cet inhibiteur est également libéré en l'absence de stimulation hormonale. Il s'agit donc probablement dans ce cas d'une substance inhibitrice non spécifique qui ne correspond pas au processus d'inhibition que nous avons décrit ci-dessus.

Par contre, EGGENA et al. (51) dans un travail plus récent observent une inhibition de la réponse à l'hormone qui n'apparaît qu'avec l'établissement du flux net d'eau ; ils en déduisent l'existence d'un phénomène d'inhibition lié à l'effet final (flux net d'eau) plutôt qu'à des événements intermédiaires. De semblables expériences ont été effectuées par MENDOZA (87) sur le transport de sodium.

Ni la nature de cette substance inhibitrice, ni son mode d'action, n'ont été déterminés. Plusieurs auteurs pensent que des prostaglandines peuvent être les modulateurs de l'adénylcyclase, (OZER et SHARP (96), ORLOFF et al. (93))dans la vessie de grenouille. C'est aussi l'idée émise par PARISI et PICCINI (100) qui ont recherché si l'effet auto-inhibiteur que nous avons observé passait par la libération de PGE_1. En présence d'inhibiteurs de la biosynthèse des prostaglandines (aspirine, indométhacine) ces auteurs observent que le flux net d'eau est plus élevé. Cependant WONG et al. (127) écartent l'hypothèse d'une régulation par les prostaglandines ; sur Bufo marinus, l'action de l'hormone n'entraîne aucune variation de leur concentration dans le tissu.

Des antagonistes des hormones ont fait l'objet de nombreuses recherches dans différents tissus. HO et SUTHERLAND (63) ont isolé un tel antagoniste impliqué dans la modération de la réponse hormonale dans les adipocytes de Rat. Une étude approfondie a montré qu'il ne s'agissait pas, également dans ce cas, d'une prostaglandine.

Des expériences complémentaires apparaissent donc nécessaires pour s'assurer que dans le cas de la perméabilité à l'eau de la vessie, des substances telles que les prostaglandines peuvent ou non être médiatrices de la boucle de régulation. Au reste, il n'est pas impensable, qu'il puisse exister plusieurs boucles régulatrices dans ce système.

Enfin des inhibiteurs de l'action propre de l'AMP_c, ont été décrits. MURAD et al. (89) ont mis en évidence un composé, voisin de l'AMP_c, métabolisé en même temps que ce dernier et qui agirait de manière non compétitive au niveau de l'activation par l'AMP_c d'une kinase. Ils détectent la présence de cet inhibiteur dans de nombreux tissus. On ne connaît pas le mécanisme de la formation de cet inhibiteur ni son rôle exact.

Il n'est pas sans intérêt également de rappeler qu'un effet rétroactif encore difficilement interprétable a été mis en évidence au niveau des premières étapes de l'action de l'hormone, à savoir l'élévation de la concentration d'AMP_c. Dans la vessie de crapaud (HANDLER et al. 56) et dans plusieurs autres tissus sensibles à des actions hormonales (21 , 55 , 72 , 83), la concentration d'AMP_c croît rapidement, puis décroît vers une valeur proche du niveau de base en dépit de la présence continue d'hormone de telle sorte que le pic de concentration du nucléotide précède de beaucoup le maximum de l'effet biologique. Il semble bien que dans ce cas intervient également un effet rétroactif négatif.

Si nous pouvons affirmer que dans la vessie de grenouille il existe bien un effet auto-inhibiteur du flux net d'eau sur lui-même, le mécanisme par lequel cet effet se manifeste est encore loin d'être déterminé.

Nous pouvons dire, en conclusion, que la perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille est sensible aux variations osmotiques de l'assise épithéliale. Jusqu'ici le schéma du mode d'action de l'hormone était un schéma linéaire : Hormone - AMP_c - effet biologique ; il semble nécessaire au vu de nos résultats, de modifier ce schéma afin de faire intervenir une boucle régulatrice qui, partant de l'effet final, vient se refermer à un endroit de la chaîne encore à déterminer et qui permet ainsi de moduler la perméabilité à l'eau de la vessie en fonction des besoins en eau des cellules.

CONCLUSION

Les amphibiens sont appelés à vivre dans des conditions où les mécanismes impliqués dans l'équilibre hydrominéral de leur milieu intérieur sont sollicités très différemment (11). Dans l'eau, la grenouille doit lutter contre une tendance à perdre ses électrolytes, dans l'air elle doit résister à une perte d'eau importante qui s'effectue principalement à travers la peau qui est très perméable à l'eau. Pour maintenir son équilibre hydrique la grenouille possède une réserve d'eau importante dans sa vessie et les hormones neurohypophysaires peuvent intervenir dans l'accroissement de la perméabilité à l'eau de cet organe.

Nous venons de décrire certains facteurs qui peuvent intervenir efficacement dans le contrôle de la perméabilité à l'eau de l'épithélium vésical : l'hypertonicité et l'hypotonicité. L'hypertonicité accroît cette perméabilité, l'hypotonicité la réduit. Il semble que ces deux stimuli n'exigent pas la présence d'hormone antidiurétique pour modifier les passages d'eau à travers la vessie. L'ensemble des étapes intervenant dans le processus de perméabilisation est en place et fonctionne indépendamment semble-t-il, de la présence de l'hormone. L'hormone antidiurétique a pu apparaître comme un perfectionnement

dans le système pour réguler les variations de perméabilité. Son site d'action se serait placé au niveau de l'une des toutes premières étapes : l'activité adénylcyclasique de la cellule.

R E S U M E

La perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille est très fortement augmentée lorsqu'elle est maintenue dans des milieux de survie hypertoniques. Cet accroissement n'est observé qu'avec des solutes non perméants et résulte probablement de la diminution de volume d'un compartiment osmosensible de ce tissu, sans doute les cellules épithéliales.

Plusieurs points communs existent entre cet effet et l'accroissement de la perméabilité à l'eau entraîné par les hormones neurohypophysaires (ADH) :

1°- Les deux sont dépendants de l'état physiologique des animaux (préadaptation contrôlée des animaux à différentes températures).

2°- Les cinétiques de réponses sont, à une constante de temps près, comparables.

3°- Certains inhibiteurs de la réponse hydrosmotique aux hormones neurohypophysaires, inhibent également la réponse aux milieux hypertoniques.

Tel est le cas, par exemple, de la noradrénaline et de la prostaglandine E_1 (PGE_1) qui agiraient en réduisant la production, par l'adénylcyclase, du médiateur de l'action hormonale : le 3', 5'-adénosine monophosphate

cyclique (AMP_c). Au contraire l'effet des milieux hypertoniques est potentialisé dans différentes conditions où existe une concentration accrue d'AMP_c tissulaire telles que l'incubation en présence d'AMP_c exogène ou de substances qui, soit comme les peptides neurohypophysaires, accélèrent la production, soit comme la théophylline, réduisent la destruction de ce nucléotide.

Cependant il existe dans l'interaction des inhibiteurs de l'adénylclase avec les deux stimuli, des différences qui suggèrent que le point d'impact de l'ADH et du stimulus hypertonique n'est pas identique. Ainsi ces inhibiteurs réduisent-ils non seulement le maximum atteint au cours de la réponse aux milieux hypertoniques mais également la vitesse avec laquelle il est atteint, ce qui n'est pas le cas lors de l'inhibition de la réponse à l'hormone. Enfin, alors que ces substances restent susceptibles de réduire la réponse à l'hormone lorsqu'elle est développée ils n'ont que peu d'effet, dans cette même condition, sur la réponse aux milieux hypertoniques qui, une fois établie, semble en grande partie indépendante de la production d'AMP_c. Cette indépendance, ainsi que l'observation d'un ralentissement de la réversibilité de la réponse soit à l'hormone, la théophylline ou l'AMP_c exogène en présence de milieux hypertoniques, nous ont amené à concevoir l'action de l'hypertonicité comme résultant d'une interférence avec la destruction d'un intermédiaire d'action plutôt qu'avec l'accélération de sa production, comme ce serait le cas lors de l'action hormonale.

A l'inverse de ce que l'on observe en milieu hypertonique, il se produit au cours de la stimulation hormonale, des variations osmotiques qui tendent à limiter l'effet de l'hormone. Dans ces conditions, le flux net d'eau transépithélial est important et les images en microscopie électronique montrent une dilatation des espaces intercellulaires et un gonflement marqué des cellules épithéliales. L'existence d'une modification parallèle de la perméabilité à l'eau est clairement mise en évidence

par l'évolution du flux net d'eau lorsqu'une préparation n'est soumise à une différence de pression osmotique entre ses deux faces qu'après avoir été préalablement incubée en présence d'hormone. Le flux net d'eau, dans ces conditions, s'établit rapidement à une valeur très élevée, nettement supérieure à sa valeur d'équilibre qu'il atteint par diminution progressive en une dizaine de minutes. Cette valeur d'équilibre est proche de celle qui est observée au cours de la réponse hormonale lorsque la stimulation s'effectue sur la préparation déjà soumise à un gradient osmotique.

Les caractéristiques de l'accroissement de la perméabilité en présence de milieux hypertoniques et l'apparition au cours de l'action hormonale de variations d'osmolarité susceptibles d'interférer avec l'action de l'hormone elle-même, nous ont conduit à suggérer l'existence au niveau cellulaire d'un système de régulation de la perméabilité à l'eau. Ce système fonctionne indépendamment de la présence d'hormone et son équilibre pourrait être modifié dans l'une ou l'autre direction sans qu'intervienne celle-ci. Une adaptation d'un de ses chaînons, l'adénylcyclase, le rend réceptif au message hormonal.

BIBLIOGRAPHIE

1 - ANDERSSON A., HELLSTRAND P., JOHANSSON B. and RINGBERG A.
Contraction of vascular smooth muscle induced by hyper-osmolality.
Acta Physiol. Scand., 1972, 84, 48 A.

2 - ARGY W.P. and HANDLER J.S.
Ca^{++} and Mg^{++} effects on toad bladder response to cyclic AMP, theophylline and ADH analogues.
Amer. J. Physiol., 1967, 213, 803.

3 - BASTIDE F. et JARD S.
Actions de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le transport actif de sodium et la perméabilité à l'eau de la peau de grenouille. Rôle du 3' 5'-AMP cyclique.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 113.

4 - BENTLEY P.J.
The effects of neurohypophysial extracts on the water transfer across the wall of the isolated urinary bladder of the toad Bufo marinus.
J. Endocrinol., 1958, 17, 201.

5 - BENTLEY P.J., KLEE A.K. and MAIN A.R.
Comparison of dehydratation and hydratation of two genera of frogs (Heleioporus and Neobatrachus) that live in areas of varying aridity.
J. Exp. Biol., 1958, 35, 677.

6 - BENTLEY P.J.
Directional differences in the permeability to water of the isolated bladder of the toad Bufo marinus.
J. Endocrinol., 1961, 22, 95.

7 - BENTLEY P.J.
Physiological properties of the isolated frog bladder in hyperosmotic solutions.
Comp. Biochim. Physiol., 1964, 12, 233.

8 - BENTLEY P.J.
Rectification of water flow across the bladder of the toad. Effect of vasopressin.
Life Sci., 1965, 4, 133.

9 - BENTLEY P.J.
The physiology of the urinary bladder of amphibia.
Biol. Rev., 1966, 41, 275.

.0 - BENTLEY P.J.
Mechanism of action of neurohypophysial hormones : Actions of mangenese and zinc on the permeability of the toad bladder.
J. Endocr., 1967, 39, 493.

11 - BENTLEY P.J. and FERGUSON D.R.
The role of the toad urinary bladder in the amphibian : 'Water balance effect' of neurohypophysial hormones.
J. Endocrin., 1967, 37, 349.

12 - BOURGUET J. et MAETZ J.
Arguments en faveur de l'indépendance des mécanismes d'action de divers peptides neurohypophysaires sur le flux osmotique d'eau et sur le transport actif de sodium au sein d'un même récepteur ; Etudes sur la vessie et sur la peau de Rana Esculenta L.
J. Biochim. Biophys. Acta, 1961, 52, 552.

13 - BOURGUET J. et JARD S.
Un dispositif automatique de mesure et d'enregistrement du flux net d'eau à travers la peau et la vessie des amphibiens.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 88, 442.

14 - BOURGUET J.
Influence de la température sur la cinétique de l'augmentation de perméabilité à l'eau de la vessie de grenouille sous l'action de l'ocytocine.
J. Physiol., 1966, 58, 476

15 - BOURGUET J. et MOREL F.
Indépendance des variations de perméabilité à l'eau et au sodium produites par les hormones neurohypophysaires sur la vessie de grenouille.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 135, 693.

16 - BOURGUET J.
Cinétique de la perméabilisation de la vessie de grenouille par l'ocytocine. Rôle du 3'-5'-AMP cyclic.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 150, 104.

17 - BOURGUET J. PARISI M. and RIPOCHE P.
Cellular osmolarity and transepithelial water permeability in frog urinary bladder.
Int. Congress Physiol. Sci., Munich 1971.

18 - BOURGUET J., PARISI M. et RIPOCHE P.
(en préparation).

19 - BRODSKY W.A. and SCHILB TH. P.
Osmotic properties of isolated turtle bladder.
Amer. J. Physiol., 1965, 208, 46.

20 - BRUNN F.
Beitrag zur Kenntnis der Wirkung von Hypophysenextrakten auf den Wasserhaushalt des Frosches.
Z. Ges. Exp. Med., 1921, 25, 170.

21 - BUTCHER R.W., HO R.J., MENG H.C. and SUTHERLAND E.W.
Adenosine 3'-5' monophosphate in biological materials.
II. The measurement of adenosine 3'-5' monophosphate in tissue and the role of the cyclic nucleotide in the lipolytic response of fat to epinephrine.
J. Biol.Chem., 1965, 240, 4515.

22 - CAMPBELL B.J., THYSEN B. and FUN SUN CHU
Peptidase catalysed hydrolysis of antidiuretic hormone in toad bladder.
Life Sciences, 1965, 4, 2129.

23 - CAPUTO C.
Volume and twitch tension changes in single muscle fibers in hypertonic solutions.
J. Gen. Physiol., 1968, 52, 793.

24 - CARASSO N., FAVARD P. et VALERIEN J.
Variation des ultrastructures dans les cellules épithéliales de la vessie du crapaud après stimulation par l'hormone neurohypophysaire.
J. de Microscopie, 1962, 1, 143.

25 - CARASSO N., FAVARD P., BOURGUET S. et JARD S.
Rôle du flux net d'eau dans les modifications ultrastructurales de la vessie de grenouille stimulée par l'ocytocine.
J. Microscopie, 1966, 5, 519.

26 - CHAN S.W.C. and PHILLIPS J.G.
Seasonal variations in production in vitro of corticosteroids by the frog (Rana rugulosa) adrenal.
J. Endocrinol., 1971, 50, 1.

27 - CHOI J.K.
The fine structure of the urinary bladder of the toad bufo marinus.
J. Cell Biol., 1963, 16, 53.

28 - CIVAN M.M. and FRAZIER H.S.
The site of the stimulatory action of vasopressin on sodium transport in toad bladder.

29 - CLAUSEN T., GLIEMAN J., VINTEN J. and KOHN P.G.
Stimulating effect of hyperosmolarity on glucose transport in adipocytes and muscle cells.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 211, 233.

30 - CORBIN J.D. and KREBS E.G.
A cyclic AMP-stimulated protein kinase in adipose tissue.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1969, 36, 328.

31 - DAINTY
The polar permeability of plant cell membranes to water.
J. Protoplasma, 1963, 57, 220.

32 - DAINTY J. and GINZBURG B.Z.
The permeability of the cell membranes of nitella translucens to urea, and the effect of high concentrations of sucrose on this permeability.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 79, 112.

33 - DAINTY J. and HOUSE C.R.
Unstirred layers in frog skin.
J. Physiol. (London), 1966, 182, 66.

34 - DAINTY J. and HOUSE C.R.
An examination of the evidence for membrane pores in frog skin.
J. Physiol. (London), 1966, 185, 172.

35 - DIAMOND J.M.
The mechanism of water transport by the gall-bladder.
J. Physiol., 1962, 161, 503.

36 - DIAMOND J.M.
The osmotic properties of cell membranes.
Biophys. J., 1965, 5, 64.

37 - DIAMOND J.M.
Non-linear osmosis.
J. Physiol., 1966, 183, 58.

38 - DIAMOND J.M. and TORMEY J.M.
Role of long extracellular channels in fluid transport across epithelia.
Nature, 1966, 210, 817.

39 - DIAMOND J.M. and BOSSERT W.H.
Functional consequences of ultrastructural geometry in 'Backwards' fluid-transporting epithelia.
J. Cell. Biol., 1968, 37, 694.

40 - DIBONA D.R., CIVAN M.M. and LEAF A.
The anatomic site of the transepithelial permeability barriers of toad bladder.
J. Cell.. Biol., 1969, 40, 1.

41 - DIBONA D.R., CIVAN M.M. and LEAF A.
Differential epithelial cell responses in toad urinary bladder to addition of vasopressin.
Fed. Proc., 1969 28, 402.

42 - DIBONA D.R. and CIVAN M.M.
Toad urinary bladder intercellular spaces.
Sciences, 1969, 165, 503.

43 - DIBONA D.R., CIVAN M.M. and LEAF A.
The cellular specificity of the effect of vasopressin on toad urinary bladder.
J. Membrane Biol., 1969, 6, 79.

44 - DIBONA D.R. and CIVAN M.M.
The effect of smooth muscle on the intercellular spaces in toad urinary bladder.
J. Cell. Biol., 1970, 46, 235.

45 - DIBONA D.R.
Passive intercellular pathway in amphibian epithelia.
Nature New Biol., 1972, 238, 179.

46 - DIBONA D.R. and CIVAN M.M.
Clarification of the intercellular space phenomenon in toad urinary bladder.
J. Membrane Biol., 1972, 7, 267.

47 - DOUSA T.P., WALTER R., SCHWARTZ I.L., SANDS H. and HECHTER O.
Role of cyclic AMP in the action of neurohypophyseal hormones on kidney.
Adv. in Cyclic Nucl. Res. Vol. I, 1972, 121.

48 - EARLEY L.E., SIDEL V.W. and ORLOFF J.
Factors influencing permeability of a vasopressin sensitive membrane.
Feder. Proc., 1962, 21, 145.

49 - EGGENA P., WALTER R. and SCHWARTZ I.L.
Relationship between hydro-osmotic flow and the inhibited response of the toad bladder to vasopressin.
Life Sci., 1968, 7, 59.

50 - EGGENA P., SCHWARTZ O.L. and WALTER R.
Action of hypertonicity on toad bladder permeability.
Physiologist., 1969, 12, 213.

51 - EGGENA P., SCHWARTZ I.L. and WALTER R.
Action of aldosterone and hypertonicity on toad bladder permeability water.
In : Reg. of fluid volumes by the kidney, 1970, 182.
Ed. : J.H. CORT and B. LICHARDUS, J. KARGER (Basel).

52 - ERLIJ D. and MARTINEZ-PALOMO A.
Opening of tight junctions in frog skin by hypertonic urea solutions.
J. Membrane Biol., 1972, 9, 229.

53 - EWER R.F.
The effects of posterior extract on water balance in Bufo carens and Xenopus laevis, together with some general considerations of anuran water economy.
J. Exptl. Biol., 1951, 29, 429.

54 - FROMTER E. and DIAMOND J.M.
Epithelial tissue. Route of passive ion permeation.
Nature New Biol., 1972, 235, 9.

55 - GILLIBRAND I.M.
Evidence for oscillatory properties in the concentrations of adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate produced by cardiac sarcoplasmique reticulum.
Biochem. J., 1970, 120, 20 P.

56 - HANDLER J.S., BUTCHER R.W., SUTHERLAND E.W., and ORLOFF J.
The effect of vasopressin and of theophylline on the concentration of adenosine 3'-5' phosphate in the urinary bladder of the toad.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 4524.

57 - HANDLER J.S., BENZINGER R., ORLOFF J.
The effect of adrenergic agents on the response of the toad urinary bladder to vasopressin.
J. Clin. Invest., 1967, 46, 1066.

58 - HANDLER J.S., BENZINGER R. and ORLOFF J.
Effect of adrenergic agents on toad bladder response to ADH, 3', 5'-AMP, and THEOPHYLLINE.
Amer. J. Physiol., 1968, 215, 1024.

59 a - HAYS R.M. and LEAF A.
Studies on the movement of water through the isolated toad bladder and its modification by vasopressin.
J. Gen. Physiol., 1962, 45, 905.

59 b - HAYS R.M. and LEAF A.
The state of water in the isolated toad bladder in the presence and absence of vasopressin.
J. Gen. Physiol., 1962, 45, 933.

60 - HAYS R.M. and FRANKI N.
The role of water diffusion in the action of vasopressin.
J. Memb. Biol., 1970, 2, 263.

61 - HAYS R.M., FRANKI N. and SOBERMAN R.
Activation energy for water diffusion across the toad bladder. Evidence against the pore enlargement hypothesis.
J. Clin. Invest., 1971, 50, 1016.

62 - HENION W.F., SUTHERLAND W. and POSTERNAK TH.
Effects of derivatives of adenosine 3'-5' phosphate on liver slices and intact animals.
Biochim. Biophys. Acta, 1967, 148, 106.

63 - HO R.J. and SUTHERLAND E.W.
Formation and release of a hormone antagonist by rat adipocytes.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 6822.

64 - HYNIE S. and SHARP G.W.G.
Inhibition by manganese of the action of antidiuretic hormone on adenyl cyclase in toad bladder.
J. Endocrinol., 1971, 50, 231.

65 - JARD S., BOURGUET J., CARASSO N. et FAVARD P.
Action de divers fixateurs sur la perméabilité et l'ultrastructure de la vessie de grenouille.
J. Microscopie, 1966, 5, 31.

66 - JARD S. and BASTIDE F.
A cyclic AMP-dependent protein kinase from frog bladder epithelial cells.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1970, 39, 559.

67 - JARD S., BOURGUET J., FAVARD P. and CARASSO N.
The role of intercellular channels in the transepithelial transfer of water and sodium in the frog urinary bladder.
J. Membrane Biol., 1971, 4, 124.

68 - JOST J.P. and RICKENBERG H.V.
Cyclic AMP.
Ann. Rev. Biochem., 1971, 40, 741.

69 - JUNGREIS A.M.
The effect of long-term starvation and acclimatation temperature on glucose regulation and nitrogen anabolism in the frog, Rana Pipiens. II. Summer animals.
Comp. Biochem. Physiol., 1970, 32, 433.

70 - KARLIN A.
The in vitro release by the toad bladder of an inhibitor of oxytocin.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 1963, 11, 44.

71 - KARLIN A. and OVERWEG N.I.A.
An inhibitor of oxytocin from the urinary bladder of the toad, Bufo marinus.
Nature, 1965, 207, 1401.

72 - KUO J.F. and DE RENZO E.C.
A comparison of the effects of lipolytic and antilipolytic agents on adenosine 3', 5'-monophosphate levels in adipose cells as determined by prior labeling with adenine 8-14C.
J. Biological Chemistry, 1969, 244, 2252.

73 - KUO J.F. and GREENGARD P.
Cyclic nucleotide dependent protein kinases. IV. Widespread occurence of adenosine 3', 5'-monophosphate dependent protein kinase in various tissues and phyla of the animal kingdom.
Proc. Nat. Acad. Sci., 1969, 64, 1349.

74 - LEAF A.
The mechanism of asymetrical distribution of endogenous lactate about the isolated toad bladder.
J. Cell. Comp. Physiol., 1959, 54, 103.

75 - LEAF A.
Some actions of neurohypophyseal hormones on a living membrane.
J. Gen. Physiol., 1960, 43, 175.

76 - LEAF A.
Membrane effects of antidiuretic hormones.
Amer. J. Med., 1967, 42, 745.

77 - LICHTENSTEIN N.S. and LEAF A.
Effects of amphotericin on the permeability of the toad bladder.
Biophys. J., 1965, 5, 119.

78 - LINDLEY B.D., HOSHIKO T. and LEB D.E.
Effect of D_2O and osmotic gradients on potential and resistance of the isolated frog skin.
J. Gen. Physiol., 1964, 47, 773.

79 - LIPSON L., HYNIES S. and SHARP G.
Effect of prostaglandin E1 on osmotic water flow and sodium transport in the toad bladder.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 180, 261.

80 - LIPSON L.C. and SHARP G.W.G.
Effects of prostaglandin E1 on sodium transport and osmotic water flow in the toad bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 220, 1046.

81 - MAETZ J., MOREL F. et RACE B.
Mise en évidence dans la neurohypophyse de Rana Esculenta L. d'un facteur hormonal nouveau stimulant le transport actif de sodium à travers la peau.
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 36, 317.

82 - MAFFLY R.H., HAYS R.M., LAMDIN E. and LEAF A.
The effect of neurohypophyseal hormones on the permeability of the toad bladder to urea.
J. Clin. Invest., 1960, 39, 630.

83 - MANGANIELLO V.C., MURAD F. and VAUGHAN M.
Effects of lipolytic and antilipolytic agents on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate in fat cells.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 2195.

84 - MARUMO F. and EDELMAN I.S.
Effect of Ca^{++} and prostaglandin E1 on vasopressin activation of renal adenyl cyclase.
J. Clin. Invest., 1971, 50, 1613.

85 - MASUR S.K., HOLTMAN E., SCHWARTZ I.L. and WALTER R.
Correlation between pinocytosis and hydroosmosis induced by neurohypophyseal hormones and mediated by adenosine 3',5' cyclic monophosphate.
J. Cell Biol., 1971, 49, 582.

86 - MASUR S.K., HOLTMANN E. and WALTER R.
Hormone stimulated exocytosis in the toad urinary bladder. Some possible implications for turnover of surface membranes.
J. Cell. Ciol., 1972, 52, 211.

87 - MENDOZA S.A., MURAD F., HANDLER J.S. and ORLOFF J.
Refractoriness of toad bladder to stimulation of sodium transport.
Amer. J. Physiol., 1972, 223, 104.

88 - MOREL F., MAETZ J. et LUCARAIN C.
Action des deux peptides neurohypophysaires sur le transport actif de sodium et le flux net d'eau à travers la peau de diverses espèces de batraciens anoures.

89 - MURAD F., RALL T.W. and VAUGHAN M.
Conditions for the formation, partial purification and assay of an inhibitor of adenosine 3', 5'-monophosphate.
Biochim. Biophys. Act., 1969, 192, 430.

90 - ORLOFF J. and HANDLER J.S.
The similarity of effects of vasopressin, adenosine 3', 5' phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder.
J. Clin. Invest., 1962, 41, 702.

91 - HANDLER J.S. and ORLOFF J.
Activation of phosphorylase in toad bladder and mammalian kidney by antidiuretic hormone.
Amer. J. Physiol., 1963, 205, 298.

92 - ORLOFF J. and HANDLER J.S.
The cellular mode of action antidiuretic hormone.
Amer. J. of Med., 1964, 36, 686.

93 - ORLOFF J., HANDLER J.S. and BERGSTROM S.
Effect of prostaglandin (PGE 1) on the permeability response of toad bladder to vasopressin, theophylline and adenosine 3', 5' monophosphate.
Nature, 1965, 205, 397.

94 - ORLOFF J. and HANDLER J.
The role of adenosine 3'-5' phosphate in the action of anti-diuretic hormone.
Amer. J. Med., 1967, 42, 757.

95 - OVERWEG N.I.
Inhibition of toad bladder and Rat uterus responses to oxytocin and other agents by toad bladder extracts.
J. Pharmacol. Exptl. Therap., 1966, 153, 314.

96 - OZER A. and SHARP G.W.G.
Effect of prostaglandins and their inhibitors on osmotic water flow in the toad bladder.
Amer. J. Physiol., 1972, 222, 674.

97 - PAK POY R.F.K. and BENTLEY P.
Fine structure of the toad urinary bladder.
J. Exp. Cell. Res., 1960, 20, 235.

98 - PARISI M., RIPOCHE P. et BOURGUET J.
Une préparation de l'épithélium isolé de la vessie de grenouille Réponses à l'ocytocine, au 3', 5'-adénosine monophosphate cyclique et à la théophylline.
Pflugers Archiv., 1969, 309, 59.

99 - PARISI M., RIPOCHE P. and BOURGUET J.
Mechanism by which hypertonic solutions increase water net flux across the frog urinary bladder.
Abstract Congres Stockholm, 1969, 261.

100 - PARISI M.T. and PICCINI Z.F.
Aspirin potentiates the hydrosmotic effect of antidiuretic hormone in toad urinary bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 279, 209.

101 - PEACHEY L.D. and RASMUSSEN H.
Structure of the toad urinary bladder as related to its physiology.
J. of Biophys. and Biochem. Cytology, 1961, 10, 529.

102 - PETERSEN M.J. and EDELMAN I.S.
Calcium inhibition of the action of vasopressin on the urinary bladder of the toad.
J. Clin. Invest., 1964, 43, 583-594.

103 - POSTERNAK T., SUTHERLAND E.W. and HENION W.F.
Derivatives of cyclic 3'-5' adenosine monophosphate.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 65, 558.

104 - RAJERISON R.M., MONTEGUT M., JARD S. and MOREL F.
The isolated frog skin epithelium. Presence of alpha and beta adrenergic receptors regulating active sodium transport and water permeability.
Pflugers Arch. Eur. Physiol., 1972, 332, 313.

105 - RAMWELL P.W. and SHAW J.E.
Biological significance of the prostaglandins.
Recent. Progr. in Horm. Res., 1970, 26, 139.

106 - RICH G.T., SHA'AFI R.I., ROMUALDEZ A. and SOLOMON A.K.
Effect of osmolality on the hydraulic permeability coefficient of red cells.
J. Gen. Physiol., 1968, 52, 941.

107 - RIPOCHE P. et BOURGUET J.
Cinétique à basse température de la perméabilisation à l'eau de la vessie de grenouille par l'ocytocine, le 3', 5'-AMP et la théophylline.
J. Physiol., 1967, 59, 482.

108 - RIPOCHE P. and BOURGUET J.
Réponses natrifériques et hydrosmotique à la théophylline chez Rana Esculenta après adaptation à basse température.
J. Physiol. (Paris), 1968, 60, 377.

109 - RIPOCHE P., PARISI M. and BOURGUET J.
Action des milieux hypertoniques sur la vessie de grenouille. Influence de la noradrénaline.
J. Physiol., 1969, 61, 1.

110 - RIPOCHE P., PARISI M. and BOURGUET J.
Mechanism of the 'antidiuretic hormone-like' action of hypertonic media on the frog urinary bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1969, 193, 231.

111 - RIPOCHE P., PARISI M. and BOURGUET J.
Effect of hypertonic media on the reversal of the hydrosmotic action of antidiuretic hormone in frog urinary bladder.
Biochim. Biophys. Acta, 1971, 241, 716.

112 - RIPOCHE P., BOURGUET J. and PARISI M.
The effect of hypertonic media on water permeability of frog urinary bladder. Inhibition by catecholamines and prostaglandin E1.
J. Gen. Physiol., 1973, 61, 110.

113 - RIPOCHE P. and PISAM M.
Ultrastructural modifications of frog urinary bladder epithelium under the influence of hypertonic media.
Z. Zellfroschung, 1973, 137, 13.

114 - SCHWARTZ I.L. and WALTER R.
Factor influencing the reactivity of the toad bladder to hydro-osmotic action of vasopressin.
Amer. J. Med., 1967, 42, 769.

115 - SHA'AFI R.I., RICH G.T., SIDEL V.W., BOSSERT W. and SOLOMON A.K.
The effect of the unstirred layer on human red cell water permeability.
J. Gen. Physiol., 1967, 50, 1377.

116 - STACY B.D. and WARNER A.C.I.
Acute effects of hypertonicity on the potential difference across the rumen wall in sheep.
Compar. Biochem. Physiol., 1972, 43, 637.

117 - SUTHERLAND E.W. and RALL T.W.
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. Biol. Chem., 1958, 232, 1077.

118 - SUTHERLAND E.W. and RALL T.W.
The relation of adenosine 3-5 phosphate and phosphorylase to the actions of catecholamines and other hormones.
Pharmacol. Rev., 1960, 12, 265.

119 - URAKABE S., HANDLER J.S. and ORLOFF J.
Effect of hypertonicity on permeability properties of the toad bladder.
Amer. J. Physiol., 1970, 218, 1179.

120 - USSING H.H.
Effects of hypertonicity produced by urea on active transport and passive diffusion through isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand., 1963, 59, suppl. 213, 155.

121 - USSING H.H. and ZERAHN K.
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited frog skin.
Acta Physiol. Scand., 1951, 23, 110.

122 - USSING H.H.
Relationship between osmotic reactions and active sodium transport in the frog skin epithelium.
Acta Physiol. Scand., 1965, 63, 141-155.

123 - USSING H.H.
Anomalous transport of electrolytes through the isolated frog skin induced by hypertonicity of the outside bathing solution.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1966, 137, 543-555.

124 - USSING H.H.
Structure and function of epithelia.
Electrophysiology of epithelial cells symposium Schloss Reinhartshausen, 1970, 3-21.

125 - USSING H.H.
Introductory remarks.
Phil. Trans., 1971, 262, 85.

126 - VOUTE C.L. and USSING H.H.
The morphological aspects of shunt-path in the epithelium of the frog skin (Rana temporaria).
Exp. Cell Res., 1970, 61, 133).

127 - WONG P.Y.D., BEDWANI J.R. and CUTHBERT A.W.
Hormone action and the levels of cyclic AMP and prostaglandins in the toad bladder.
Nature New Biol., 1972, 238, 27.